

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**FUNCIÓN DE PKD Y SU SUSTRATO KIDINS220  
EN LINFOCITOS T POLARIZADOS**

**TESIS DOCTORAL**

ROBERTO MARTÍN JEAN-MAIRET

Madrid, 2007



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**FUNCIÓN DE PKD Y SU SUSTRATO KIDINS220  
EN LINFOCITOS T POLARIZADOS**

**TESIS DOCTORAL**

Memoria presentada  
por Roberto Martín Jean-Mairet  
para optar al título de Doctor  
Madrid, Febrero de 2007





El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Endocrinología Molecular y Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Teresa Iglesias Vacas.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias al disfrute de una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.



A mis padres y a toda la gente  
que me quiere



*“El molino ya no está;  
pero el viento sigue todavía.”*  
VAN GOGH, carta a Théo



# AGRADECIMIENTOS

Como es de bien nacidos ser agradecidos, he de reconocer a una larga lista de gente, tanto del mundo de la ciencia como de fuera de él, el haberme ayudado, apoyado, escuchado o simplemente querido a lo largo de estos cinco años de tesis.

No quisiera dejar de agradecer los aprendizajes iniciales que me brindaron numerosas personas del Hospital de la Princesa allá por mis comienzos en este mundo de la ciencia, a los Drs. Manuel Ortiz de Landázuri y Francisco Sánchez Madrid y por extensión a toda la gente de sus laboratorios con mención especial a Julián y Silvia.

Tras la dura decisión de cambiar de proyecto quiero agradecer en primer lugar a Teresa, la calida acogida en el laboratorio, el trato personal y el apoyo prestado a lo largo de estos años.

A mis compañeros de laboratorio, Lucía, Celia, Alonso y Noemí por su ayuda y por la convivencia siempre correcta y agradable.

A mis vecinos de enfrente actuales y pasados, Irene, Lorena, Josué, María, Jesús y Víctor por las charlas durante la comida, las bromas dentro y fuera del laboratorio y los “prestamos” de material de “última hora” que tantas y tantas veces me salvaron de un apuro.

A María Ángeles Rodríguez y Margarita Díaz Guerra así como al resto de la gente del 2.7 Rubén, Sergio, Mónica, Oscar y Eva, por la convivencia y por abrirnos las puertas de su laboratorio allá por los primeros tiempos. A Sergio por las charlas científicas y mundanas en presencia o ausencia de una cervecita. A Rubén por las discusiones sobre política y otros menesteres.

A José Luís Rodríguez y Lorena Riol-Blanco por su inestimable ayuda con los ensayos de migración, así como por sus consejos y su simpatía.

De entre todos los becarios precarios que he cruzado por los pasillos del IIB quiero saludar y agradecer su amabilidad a varias personas, a cada una de ellas por distintos motivos pero a todas por una misma causa la de hacerle la vida más feliz y llevadera a un servidor y por ser tan buena gente. A Toño, por sus “recetas” para los westerns y sus relatos sobre sus desventuras y peripecias en sus diversos viajes. A Bea, por aquellas largas conversaciones tratando de arreglar el mundo. A Jacinto, por su inocencia, su cordialidad y su profundo respeto a las opiniones ajenas por mucho que diverjan de las suyas. A Elena, por su locuacidad y sus “detalles” culinarios (eres una maestra de la cocina!!). A Oscar, por su animosa verborrea y su “pasión” por catalunya. A toda la plana de “futboleros”, en especial a la gente del 2.9 y a mi compañero de laboratorio y de “dream team” Alonso.

Como “mi sitio de trabajo” no solo de científicos se puebla, quiero agradecer el trato y la amabilidad dispensada durante estos años por diversas personas del Centro no relacionadas con la ciencia: Gabriel, Carlos, Alejandra, Fernando, la maravillosa gente de cocina de medios, almacén, imagen y radiactividad.

Pero la vida no solo es aquello que acontece mientras uno está trabajando, así es que quiero agradecer a mis compañeros y amigos de la facultad el seguir siendo un referente para mí. Al Willy, por su incomparable don para provocar la risa ajena, su contagioso ánimo fiestero y por estar ahí y echarme un cable en los momentos malos. A Miguelón, por su serena ironía, su imperturbable tranquilidad ante el peligro y su increíble adaptación al medio nocturno. A David, por su inteligente sentido del humor, su sensibilidad, y por las muchas excursiones, canciones y reflexiones compartidas. A Santi, por su inacabable verborrea, su memoria enciclopédica y su resignación samaritana. A Marga, por su voluble espiritualidad y por su naturalidad y complicidad con el genero débil, aguantándonos a todos nosotros. A Inma, por su sempiterna sonrisa y por seguir siendo la principal organizadora de fiestas “con comida”. A estos hermanos de leche he de unir otros que, sin provenir de la misma carrera o sin haberla realizado siquiera, han pasado a formar parte por derecho propio de mi extensa familia. Es el caso de Javi “Mazas”, el tipo más crápula y juerguista que mis ojos han visto nunca, así como Susana, maravillosa peluquera y vecina, y mejor persona. A todos ellos recordarles que: “Se os quiere, carajo”.

También quiero agradecer a Tomy, Víctor y demás “hortalizos” por esos partidos de fútbol de los sábados que contábamos por derrotas, así como por las “tornées vallecanas”. Al resto de colegas Mariano, Modesto, Javi, María, Gilda, Mario, Iván, Pilar, Amable, Alex, Oliver, Gema así como a los “recién llegados” Ryan y Daniele por todos los buenos ratos pasados en su compañía. A Lorena por todos los buenos momentos pasados a su lado durante este último año.

Este apartado quedaría inconcluso sin mencionar a toda la buena gente de la Escuela Popular de Prosperidad, en particular a mis compañeras de “español” Charo y Gema así como a Manuel, Ernesto, Alba, Félix, Mariano, Frago, Fernando, Paloma y al resto del personal, por hacerme ver que la convergencia de esfuerzos individuales en un proyecto colectivo siempre es más productiva y placentera que la divergencia debido a la competición entre personas. Y por último a la gente de la Piluka y en particular a los del equipo de baloncesto por convertir el Barrio del Pilar en “mi casa”. Al Josua, Sabin, Juanillo, Carlos, Virus, Rubén, Goku, Nachete y al resto del personal.

A Maricarmen, por los ocho años que pasé contigo, por tu sinceridad e integridad como persona, por todo el cariño que me has dado y por tu forma de ser, para que sepas que por mucho tiempo que pase siempre podrás contar conmigo... de corazón.

A mis padres, por su infatigable apoyo, por el énfasis puesto en mi educación y el desarrollo de conocimientos salvaguardándome siempre de las verdades absolutas, por inculcarme valores como la humildad, la honradez y la dignidad, y que estos no deben cambiarse o abandonarse nunca por dinero, y por enseñarme el respeto al otro por encima de las diferencias de raza, clase, credo o género.

A mi hermano, por su humor ácido y sus incomparables tarjetas de cumpleaños y porque “tu sabes que yo te entiendo”.

A toda mi familia, abuelos, tíos y primos, por el cariño y la ayuda prestada a lo largo de todos estos años. Sin vuestro apoyo nada sería lo mismo.

A la memoria de mi abuelo Andrés, por haber cuidado tanto de su nieto.

A mi compañera de seis cuerdas por proporcionarme tan buenos momentos.

A “nuestros bisabuelos” por dar ejemplo, porque por mucho que pasen los años, incluso en estos tiempos, aún seguimos siendo unos cuantos los que día a día soñamos con un mundo más justo y menos cruel... imprescindiblemente necesario.







**SUMMARY**  
**RESUMEN**



The Kinase D interacting substrate of 220 kDa (Kidins220) is a novel protein of unknown function, mainly expressed in brain and cells of nervous origin and that was identified as the first substrate of protein kinase D1 (PKD1). In the first part of the Thesis we show that Kidins220 is also expressed in T lymphocytes and that in polarized T cells, it is highly concentrated at the uropod. Kidins220 co-localizes with the adhesion molecules clustered in this cellular structure, intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3), CD43 and CD44. We also demonstrate that Kidins220 is present at uropod membrane lipid rafts and interacts with caveolin-1, a molecule that we prove here to be expressed in various T cells. Furthermore, we find that the adhesion molecule ICAM-3 and also the ERM proteins interact with Kidins220 in polarized T lymphocytes. Our data demonstrate that Kidins220 asymmetrical distribution and association with ICAM-3 depend on molecular mechanisms that involve the actin cytoskeleton and protein kinase C (PKC) pathways. Our findings also show that Kidins220 plays a role in T cell homotypic adhesion and in the chemotactic response to SDF-1 $\alpha$  and suggest that it may play a role in cell polarity. In the second part of the Thesis we find that PKD also interacts and partially colocalizes with ICAM-3 at the rear part of polarized T cells by PKC dependent mechanisms. We next prove that PKD interacts with but does not phosphorylate ERM proteins. On the other hand, we show that ICAM-3 is a PKD substrate and identify various PKD phosphorylation sites in the cytoplasmic tail of this adhesion molecule. Furthermore, we demonstrate here that PKD plays an important role in crucial functions of T lymphocytes. PKD increases T cell adhesion to fibronectin and its kinase activity enhances T cell homotypic adhesion promoted either by phorbol esters or by the engagement of ICAM-3. These intercellular interactions potentiated by ectopically expressed PKD also depend on ICAM-3. Additionally, we find that engagement of ICAM-3 increases the phosphorylation of PKD at the Ser916 and that this phosphorylated enzyme translocates at the centre of multicellular clusters induced by ICAM-3 pro-aggregatory antibodies. Finally, expression of PKD promotes T cell motility and up-regulates T cell chemotaxis in response to SDF-1 $\alpha$ . Here we present for the first time data that demonstrate the participation of PKD on chemokine signalling pathways and therefore on the chemotactic response, a crucial process for T lymphocyte function and immune responses.



# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN.....23

### I1- La polarización de los linfocitos T

- I1.1- El urópodo
- I1.2- Papel del citoesqueleto de actina y las proteínas asociadas a esta en la polarización
- I1.3- La familia de proteínas ERM
- I1.4- Papel de las balsas lipídicas o *lipid rafts*

### I2- Importancia de la regulación de los procesos de adhesión

- I2.1- Rutas de señalización que controlan la activación de integrinas
- I2.2- Adhesión célula-MEC y célula-endotelio y regulación de la migración
- I2.3- Adhesión célula-célula; reclutamiento, activación y trans migración de los linfocitos T

### I3- La molécula de adhesión intercelular ICAM-3

- I3.1- La familia ICAM
- I3.2- Estructura y ligandos de ICAM-3
- I3.3- Relevancia funcional e inducción de rutas de señalización a través de ICAM-3
- I3.4- Importancia del dominio citoplasmático de ICAM-3 y su fosforilación

### I4- Las quimioquinas

- I4.1- La quimioquina SDF-1 $\alpha$

### I5- La Proteína Quinasa D

- I5.1- Estructura
- I5.2- Rutas de activación y funciones principales de PKD
- I5.3- Implicaciones de PKD en el sistema inmune
- I5.4- Función de PKD en los procesos de adhesión y migración

### I6- Kidins220

- I6.1- Estructura
- I6.2- Distribución/Localización y vías de señalización en las que participa Kidins220
- I6.3- Kidins220 se expresa en células del sistema inmune

## OBJETIVOS.....45

## MATERIALES Y MÉTODOS.....49

### M1- Reactivos y materiales

### M2- Plásmidos y construcciones

- M2.1- Vectores de expresión de PKD1 y sus mutantes en células eucariotas
- M2.2- Vectores de expresión de proteínas recombinantes bacterianas del dominio citoplásmico de ICAM3 y sus mutantes
- M2.3- Vectores de expresión de proteínas recombinantes bacterianas del dominio catalítico de PKD1 y sus mutantes
- M2.4- Vectores para la expresión ectópica de Kidins220

### M3- Purificación de proteínas de fusión a GST

M3.1- Purificación de GST-ICAM-3wt citoplásmico así como de los distintos mutantes puntuales GST-ICAM-3-S487A, GST-ICAM-3S489A, GST-ICAM-3S496A, GST-ICAM-3T497A Y GST-ICAM-3S503A

M3.2- Purificación de los dominios catalíticos de PKD1, GST-PKD1cat-WT y GST-PKD1cat-km

#### **M4- Cultivos celulares y tratamientos**

#### **M5- Análisis de expresión de Kidins220 y caveolina-1 por RT-PCR**

#### **M6- Inmunoprecipitaciones y análisis por Western Blot**

#### **M7- Aislamiento de Balsas Lipídicas o *Lipid Rafts***

#### **M8- Ensayos de Actividad quinasa *in vitro* de PKD**

M8.1- Ensayos IVK de PKD en inmunoprecipitados de lisados celulares

M8.2- Ensayos IVK de PKD1 con fragmentos de proteínas puras recombinantes fusionadas a GST

M8.3- Ensayos IVK de PKD1 con péptidos

#### **M9- El problema del Ac anti-PKD**

#### **M10- Inmunofluorescencias y microscopía confocal**

#### **M11- Transfecciones transitorias**

#### **M12- Ensayos de migración y quimiotaxis**

#### **M13- Ensayos de motilidad**

#### **M14- Ensayos de adhesión a fibronectina**

#### **M15- Ensayos de agregación**

#### **M16- Ensayos de microscopía confocal *in vivo***

## **RESULTADOS.....65**

#### **R1- Kidins220 se expresa en linfocitos T**

#### **R2- Kidins220 se localiza en el urópodo de linfocitos T polarizados**

#### **R3- Kidins220 está embebido en *lipid rafts* enriquecidos en GM1 e interacciona con caveolina-1 en linfocitos T polarizados**

R3.1- Importancia de las balsas lipídicas ricas en GM1 en la distribución de Kidins220 en linfocitos T polarizados

R3.2- Los linfocitos T expresan caveolina-1

R3.3- Kidins220 se encuentra embebido en balsas lipídicas e interacciona con caveolina-1

#### **R4- Kidins220 interacciona con ICAM-3 y con la familia de proteínas ERM**

#### **R5- La despolarización de células T altera la localización de Kidins220 en el urópodo y afecta a su asociación con ICAM-3**

R5.1- La desorganización del CK de actina altera la distribución de Kidins220 e ICAM-3, disminuyendo drásticamente su asociación

R5.2- Implicación de las vías de PKC en la localización de Kidins220 en el urópodo y su interacción con ICAM-3

R5.3- Estudio del papel de Kidins220 en la distribución polarizada de ICAM-3

#### **R6- Kidins220 participa en las adhesiones intercelulares promovidas por ésteres de forbol**

#### **R7- Kidins220 participa en la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$**

#### **R8- PKD interacciona con Kidins220 en linfocitos T polarizados**

#### **R9- PKD co-localiza e interacciona con ICAM-3**



- R10-** La interacción de ICAM-3 con la fracción fosforilada/activa de PKD depende de las vías de PKC
- R11-** Las vías de señalización de PKC regulan la interacción de ICAM-3 con las proteínas ERM fosforiladas
- R12-** PKD interacciona con las proteínas ERM pero no participa en su fosforilación
- R13-** ICAM-3 es sustrato *in vitro* de PKD
- R13.1-** PKD fosforila el dominio citoplásmico de ICAM-3
- R13.2-** Mapeo del sitio de fosforilación por PKD
- R14-** Estudio funcional de PKD en la línea de linfocitos T polarizados Peer
- R14.1-** Distribución celular de los distintos mutantes de PKD1 en células Peer
- R14.2-** La sobre-expresión de PKD1wt, o de los mutantes activo o inactivo, no afecta a la polaridad de las células Peer
- R15-** PKD promueve la adhesión a fibronectina
- R16-** PKD participa en la adhesión homotípica célula-célula de los linfocitos T
- R16.1-** PKD aumenta la adhesión intercelular promovida por PDBu
- R16.2-** PKD aumenta la adhesión intercelular basal y la promovida por la activación de ICAM-3
- R16.3-** La adhesión intercelular homotípica promovida por PKD es dependiente de ICAM-3
- R16.4-** La activación de ICAM-3 promueve la activación/fosforilación de PKD
- R16.5-** Estudio de la distribución de PKD en respuesta al Ac HP2/19 en la línea de linfocitos T no polarizada JHM1.2-2
- R17-** PKD regula la migración, quimiotaxis y motilidad de las células Peer
- R17.1-** La actividad de PKD regula la trans-migración y la quimiotaxis frente a SDF-1 $\alpha$
- R17.2-** PKD promueve la motilidad sobre fibronectina en linfocitos T polarizados
- R17.3-** SDF-1 $\alpha$  promueve la fosforilación de PKD
- R18-** Estudio de la distribución de PKD en respuesta a la polarización con SDF-1 $\alpha$  en células JHM1-2.2

## **DISCUSIÓN.....115**

- D1-** Kidins220; un nuevo componente estructural del urópodo embebido en balsas lipídicas
- D2-** La polaridad celular modula la interacción entre Kidins220 e ICAM-3; implicación de las vías de PKC
- D3-** Kidins220, un buen candidato a participar en la polaridad celular
- D4-** Kidins220, un buen candidato como regulador de los procesos de adhesión intercelular en leucocitos
- D5-** La participación de Kidins220 en la quimiotaxis promovida por SDF-1 $\alpha$
- D6-** La relación SDF-1 $\alpha$ -Kidins220 y el posible paralelismo con su función en el sistema nervioso y la activación de los linfocitos T
- D7-** PKD, una quinasa enriquecida en el urópodo que se asocia y fosforila a ICAM-3
- D8-** PKD, una quinasa implicada en los procesos de adhesión de los linfocitos T
- D8.1-** PKD participa en la adhesión célula T-MEC
- D8.2-** PKD participa en la adhesión intercelular homotípica en linfocitos T

D9- PKD promueve la motilidad de los linfocitos T

D10- Participación de PKD en la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$

D11- ¿Que ocurre con las distintas isoformas de PKD en linfocitos?

**CONCLUSIONES.....135**

**ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....139**

**BIBLIOGRAFÍA.....141**

**ANEXOS.....161**

## INTRODUCCIÓN



Los linfocitos T en estado de reposo circulan por los vasos sanguíneos y los nódulos linfáticos a la espera de su encuentro con las células presentadoras de antígeno (APC). Para que la estimulación de los linfocitos T se produzca es necesario que entren en contacto con APC provenientes de tejidos periféricos inflamados que presentan asociado a su complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II el péptido patogénico que será reconocido específicamente por el receptor de antígeno de las células T (TCR). Tras su activación, los linfocitos T proliferan rápidamente y adquieren la capacidad de acceder a tejidos no linfoides.

La extravasación de los linfocitos del torrente sanguíneo y su consiguiente migración hacia los tejidos inflamados son procesos cruciales de la respuesta inmune, que requieren previamente y de forma indispensable la adquisición de una morfología polarizada. La polarización es esencial para la correcta regulación de los procesos de adhesión que dirigen la generación de la fuerza locomotriz que permite el desplazamiento de las células así como para la compartimentalización de la señalización intracelular que guía la direccionalidad de los linfocitos en respuesta a gradientes quimiotácticos.

## 11- La polarización de los linfocitos T

La adquisición de una morfología polarizada es un requerimiento esencial para diversos procesos biológicos llevados a cabo por los linfocitos como la migración, la activación o la apoptosis<sup>(60)</sup>.

La polarización es un proceso clave que mediante interacciones dinámicas, conlleva entre otros cambios al reagrupamiento de receptores y contrareceptores en distintos compartimentos de la membrana, permitiendo el establecimiento de un “diálogo” entre el linfocito y el medio circundante o el linfocito y las células vecinas. La polarización de los linfocitos T se induce: 1) En respuesta a la estimulación por citoquinas o quimioquinas presentes en la matriz extracelular (MEC) o en la superficie de las células endoteliales de los vasos

sanguíneos<sup>(46)</sup>; 2) Tras la activación de los linfocitos al entrar en contacto con APC<sup>(136, 137)</sup>; 3) Al producirse la unión entre el linfocito T citotóxico y la célula diana<sup>(78)</sup>; 4) Durante las infecciones célula T-célula T por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)-1<sup>(59)</sup>. Todos estos eventos promueven la diferenciación antero-posterior de las células dando lugar a la formación de dos polos (Fig. 11): el frente de avance, sitio de anclaje al sustrato y principal responsable del movimiento direccional de los linfocitos T, y el urópodo, una región involucrada principalmente en las interacciones célula-célula así como en varios procesos biológicos como la activación o la apoptosis de los linfocitos<sup>(60, 232)</sup>.

### 11.1-El urópodo

El urópodo es una protuberancia de gran tamaño (puede alcanzar hasta seis veces el tamaño del cuerpo celular) presente en la parte trasera de los linfocitos que crece y se retrae de forma rápida y reversible. Ante todo es una estructura adhesiva cuyo continuo movimiento le permite escanear de forma constante el medio circundante así como “palpar y probar” (*touching and tasting*) la superficie de las células vecinas<sup>(60)</sup>. Reagrupa numerosas moléculas de adhesión entre las cuales se encuentran ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*)-1,-2,-3, CD2, CD43, CD44, PSGL-1 (*P-Selectin Glycoprotein ligand-1*), L-selectina<sup>(45, 146, 226)</sup>. Aunque su papel específico en la fisiología del linfocito T está aún por dilucidar, diversos trabajos lo han involucrado en el anclaje del linfocito a la MEC<sup>(71)</sup> y el reclutamiento de linfocitos circundantes en estado de reposo<sup>(41, 43)</sup>, favoreciendo los procesos de extravasación y migración hacia los tejidos inflamados. A su vez, la retracción del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y de gran parte de la rígida red de microtúbulos en el urópodo aumenta enormemente la capacidad de deformación de los linfocitos, facilitando el desplazamiento de estos por espacios reducidos<sup>(213)</sup>. Además, la formación del urópodo y el reagrupamiento de complejos inductores de muerte celular en dicha

estructura es un proceso clave para la inducción de apoptosis a través de CD95/Fas <sup>(201)</sup>.

El papel de los distintos polos en los contactos iniciales célula T-APC es motivo de controversia, así mientras determinadas observaciones morfológicas parecen implicar al urópodo de los linfocitos T otros estudios más recientes apoyan lo contrario <sup>(114, 134)</sup>.

### 11.2- Papel del citoesqueleto de actina y las proteínas asociadas a esta en la polarización

La primera evidencia de la importancia del citoesqueleto (CK) de actina en la polarización de los linfocitos y por ende en el establecimiento de la respuesta inmune *in vivo*, vino dada por el síndrome de Wiskott Aldrich (WAS), una inmunodeficiencia ligada a una mutación en el gen WASp, codificante para una proteína involucrada en el control de la organización del CK de actina <sup>(274)</sup>, cuyos pacientes no presentan linfocitos polarizados <sup>(174)</sup>.

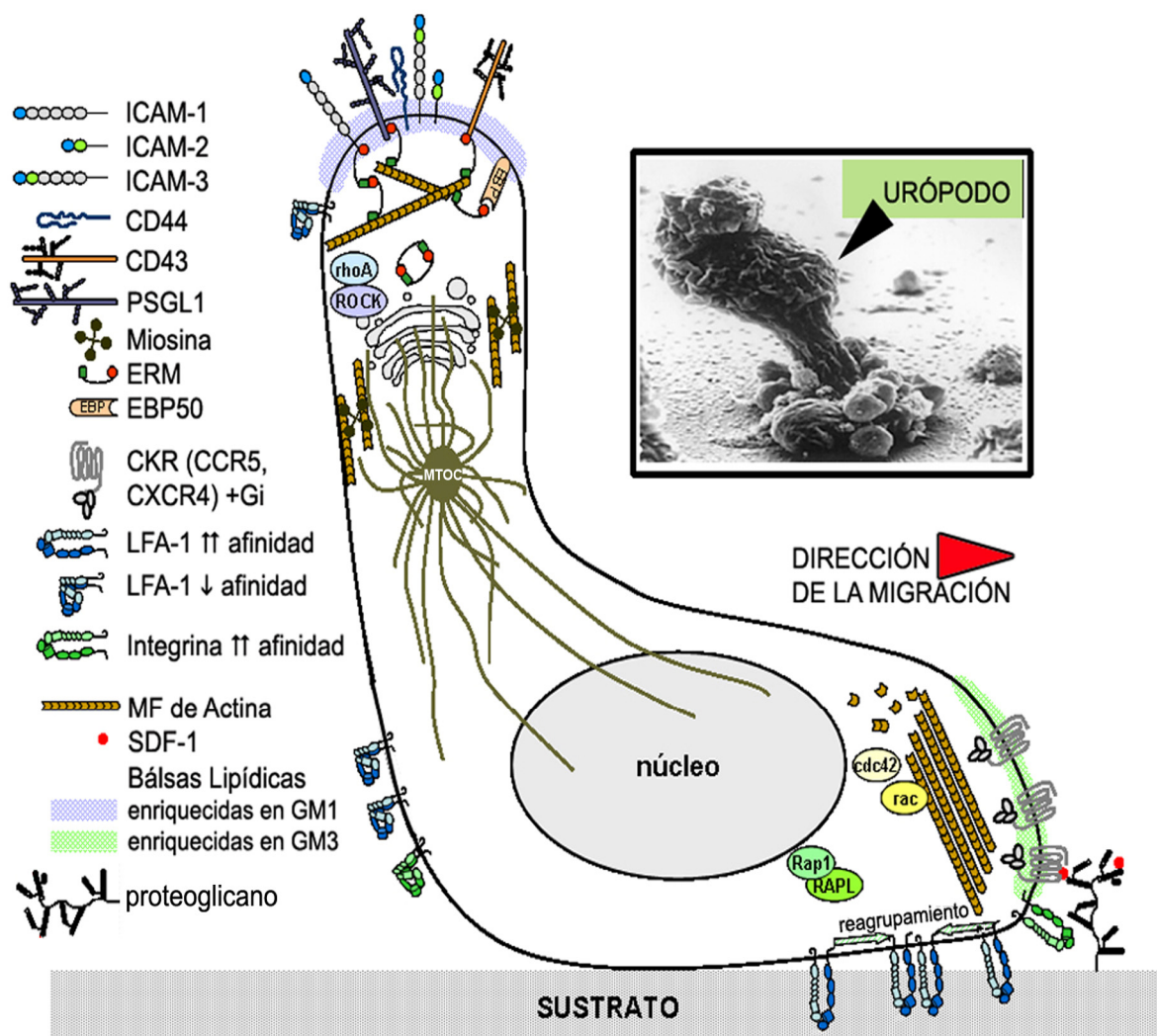
Durante la polarización de los linfocitos migratorios en respuesta a estímulos quimiotácticos, el CK de actina sufre una fuerte reorganización. Así mientras los procesos de polimerización de actina se concentran principalmente en el frente de avance, la contracción de las estructuras de acto-miosina inducen la formación del urópodo <sup>(232)</sup>. De hecho, la proteína motora miosina II se localiza en el cuello del urópodo y es crítica para la formación y el reclutamiento de diversas moléculas de adhesión a esa estructura <sup>(45)</sup>. El grado de polarización depende también de las interacciones específicas entre la membrana plasmática y el CK de actina a través de proteínas puente. La familia de proteínas ERM (Ezrina/Radixina/Moesina) juega un importante papel en este tipo de interacciones, aunque otras proteínas asociadas al CK de actina como vinculina,  $\alpha$ -actinina, palidina y talina también participan en el establecimiento de la polaridad celular <sup>(239)</sup>.

### 11.3- La familia de proteínas ERM

Ezrina, radixina y moesina son tres proteínas con un alto grado de homología (alrededor del 75%) que, junto con merlina/schwannomina, constituyen la familia de proteínas ERM <sup>(23)</sup>. Se caracterizan por presentar una región amino terminal (N-terminal) globular de 300 residuos, el dominio FERM (*Four.1-Ezrin-Radixin-Moesin*), también presente en múltiples moléculas con actividad tirosina quinasa y tirosina fosfatasa, que les permite interactuar con distintas proteínas transmembrana así como con componentes de diversas cascadas de señalización. A su vez, su región carboxilo terminal (C-terminal) presenta un sitio de unión a actina filamentosa (F-actina) (ver Fig. 11). Estas proteínas pueden presentarse en una conformación inactiva, donde la asociación del dominio FERM con la cola C-terminal (intramolecular mediante plegamiento o intermolecular formando homo u heterodímeros) enmascara los sitios de unión a proteínas de membrana y a F-actina <sup>(74, 75, 206)</sup>. Su activación se produce gracias a la unión de fosfoinosítidos al dominio FERM induciendo cambios conformacionales y a la fosforilación de varios residuos de treonina en la región C-terminal <sup>(16, 66, 164, 208)</sup>.

En un contexto general, las proteínas ERM participan en numerosas rutas de señalización implicadas en morfogénesis, adhesión, motilidad y proliferación. Al co-expresarse en numerosos tipos celulares las funciones específicas de cada una de ellas siguen siendo una incógnita, y la ausencia de alteraciones generales en los distintos ratones *knock-out* de las proteínas ERM apuntan a una cierta redundancia funcional <sup>(51)</sup>.

En linfocitos, se expresan tanto moesina como ezrina, siendo la primera la forma predominante. La presencia de radixina es sin embargo motivo de controversia <sup>(35, 113, 232, 239)</sup>. Las proteínas ERM están involucradas en la reorganización de la membrana durante los procesos de polarización celular llevados a cabo por los linfocitos T al migrar o al establecerse la sinápsis inmunológica (SI) entre este y la APC <sup>(35)</sup>. Así, a través de su dominio FERM, y de forma directa o indirecta (a través de la



**Figura 11. Linfocito T polarizado**

Los linfocitos T polarizados, presentan dos polos bien diferenciados: El frente de avance, donde se concentran los receptores de quimioquinas y los procesos de polimerización de actina responsable del movimiento direccional de los linfocitos T, y el urópodo, protuberancia que puede estar dispuesta en paralelo al lado del sustrato en el polo opuesto al frente de avance o emerger apicalmente con respecto al cuerpo celular de forma perpendicular al sustrato, y que reagrupa diversas moléculas de adhesión. Este polo trasero, es fácilmente identificable frente a otras estructuras de membrana (lamelipodios, filopodios, dendritas) por su gran tamaño. Véase como ejemplo el recuadro derecho presentando la imagen de un linfocito T de microscopía electrónica de barrido a 2000 aumentos tomada del trabajo de Fais S and Malorni W <sup>(60)</sup>.

proteína adaptadora EBP50 (*ERM-Binding Phosphoprotein 50*), las proteínas ERM reagrupan en el urópodo a diversas proteínas integrales de membrana tales como ICAM-1,-2,-3, CD43, CD44, PSGL-1, L-selectina y CD95/Fas <sup>(4, 141, 201, 237, 238, 240)</sup>. Además, parecen jugar un papel importante en la generación y mantenimiento de dicha estructura aunque el modo en que contribuyen a la formación de esta protuberancia trasera no está del todo claro <sup>(24, 141)</sup>.

Las proteínas ERM también están involucradas en la polarización de la célula T necesaria para el establecimiento del contacto con la APC, así tanto ezrina como moesina han sido observadas en la zona de formación de la SI <sup>(37, 227)</sup>. Sin embargo, una vez establecida la SI las proteínas ERM se trasladan fuera de la zona de interacción célula T-APC, para dirigir la exclusión de determinadas moléculas, como CD43, de

la zona de contacto <sup>(6, 47, 243)</sup> y permitir el aplanamiento y la extensión de dicha zona.

Curiosamente, tanto la estimulación antigénica como con quimioquinas promueve la defosforilación de las proteínas ERM <sup>(24, 62)</sup>. Esta inactivación modularía la rigidez celular, permitiendo la formación de conjugados célula T-APC en el primer caso, o la formación del urópodo con la consiguiente adquisición de una morfología apta para la migración en el segundo caso.

Numerosos trabajos han investigado la fuerte interrelación entre las proteínas ERM y la familia de pequeñas GTPasas Rho (RhoA, Rac1 y Cdc42). Esta familia de proteínas es crucial en los procesos de polarización y migración de los linfocitos T al controlar los distintos procesos mediados por el CK de actina, en gran parte debido a su papel clave en la regulación de la activación de las proteínas ERM <sup>(113)</sup>. A su vez, estas últimas participan en las rutas de señalización reguladas por la familia Rho, modulándolas al interactuar con numerosos efectores o reguladores de dichas GTPasas, tales como RhoGDI, Dbl, Hamartina, Crk, Pak-1 o N-WASP <sup>(35, 113)</sup>.

#### **11.4- Papel de las balsas lipídicas o *lipid rafts***

En los últimos años se ha incrementado el número de evidencias que demuestran que la compartimentalización de la membrana plasmática en distintos microdominios es fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad de los linfocitos <sup>(5,158)</sup>. En condiciones basales estos presentan balsas lipídicas de pequeño tamaño, muy inestables, que en respuesta a antígeno (Ag) o a quimioquinas se fusionan dando lugar a microdominios lipídicos de mayor tamaño y estabilidad. Estos últimos actúan como plataformas para el transporte de proteínas de membrana y sus correspondientes moléculas transductoras de señal a distintas regiones específicas del linfocito <sup>(82, 290)</sup>.

Así, en respuesta a estímulos quimiotácticos el linfocito T redistribuye los *lipid rafts* ricos en GM1 (gangliósido

de tipo 1) al urópodo mientras que los microdominios ricos en GM3 se reagrupan en el frente de avance. Estos reagrupamientos lipídicos arrastran a dichas estructuras a distintas proteínas integrales de membrana como CD44 e ICAM-3 al urópodo <sup>(81, 180)</sup> o receptores de quimioquinas como CXCR1 y CXCR4 al frente de avance <sup>(81, 117)</sup>. A su vez, la asociación a las balsas lipídicas de proteínas como PI3K (Fosfatidilinositol-3 quinasa) <sup>(82)</sup>, Rac <sup>(40)</sup> o Cdc42 <sup>(80)</sup>, involucradas en la transducción de señales y la reorganización del CK de actina, permiten la restricción espacial de sus vías de señalización en el frente de avance <sup>(303)</sup>.

Por otro lado, la co-estimulación de los linfocitos T provoca el reclutamiento de los microdominios ricos en GM1 a la zona donde se reagrupa el TCR <sup>(290)</sup>. Estudios posteriores con marcadores de *lipid rafts* como GFP-GPI o MyrPalm-mCFP, han permitido verificar las dinámicas de re-localización de estos microdominios a la SI en los conjugados célula T-APC <sup>(308)</sup>.

La segregación espacial de las balsas lipídicas depende de la integridad del CK de actina <sup>(222)</sup>. Varias proteínas de unión a actina como talina, vinculina y miosinas están asociadas a estos microdominios, y las proteínas ERM juegan un papel clave en su redistribución a la SI <sup>(112, 276)</sup>. A su vez, los *lipid rafts* están enriquecidos en fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato que, al controlar la actividad de las GTPasas Rac y Cdc42, es uno de los principales reguladores de la reorganización del CK de actina <sup>(31)</sup>.

## **I2- Importancia de la regulación de los procesos de adhesión**

Las integrinas son una familia de receptores de superficie celular que median la adhesión a otras células así como a la MEC. Estos receptores son heterodímeros compuestos por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ . Hasta la fecha se conocen 18 subunidades  $\alpha$  y 8  $\beta$  que dan lugar a 24 tipos diferentes de integrinas, tres de los cuales juegan un papel fundamental en leucocitos.



Estos son las integrinas  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$  o LFA-1 (*Lymphocyte Function associated Antigen 1*),  $\alpha\text{4}\beta\text{1}$  o VLA-4 (*Very Late Antigen 4*) y  $\alpha\text{4}\beta\text{7}$  <sup>(101, 129)</sup>.

Las células T utilizan las integrinas para todas sus funciones: para la continua recirculación en el torrente sanguíneo hacia y desde los nódulos linfoides, para la extravasación y la migración a otros tejidos tras una infección y para el establecimiento de los conjugados célula T-APC <sup>(101, 129)</sup>.

### 12.1- Rutas de señalización que controlan la activación de integrinas

Los linfocitos no estimulados son células no adherentes que en respuesta a la presencia de quimioquinas o al reconocimiento del complejo Ag-MHC por el TCR adquieren la capacidad de adherirse a la MEC o a las células vecinas. Las rutas de señalización activadas por estos estímulos son conocidas como señalización *inside-out*, y regulan las propiedades adhesivas (o avidéz) de las integrinas modulando la afinidad de estas por sus respectivos ligandos y su reagrupamiento en distintas regiones de la membrana (fenómeno denominado regulación de la valencia).

A su vez, las interacciones entre los receptores y sus contrareceptores, que modulan la adhesión celular, pueden dar lugar en algunos casos a diversas rutas de señalización intracelular denominadas *outside-in* que regulan diversos aspectos de las células (reorganización del CK, cambios morfológicos de la célula, activación de la transcripción génica o secreción de factores al medio).

Varias son las proteínas y rutas de señalización implicadas en la regulación de las adhesiones inmunes mediadas por las integrinas  $\beta\text{1}$  y  $\beta\text{2}$ . Los numerosos estudios realizados hasta la fecha señalan como principales moduladores de dichas adhesiones a las quinasas “lipídicas” (o reguladas por segundos mensajeros lipídicos), las familias de GTPasas Ras y Rho y sus proteínas adaptadoras y reguladores <sup>(129)</sup>.

La pequeña GTPasa Rho-A y su efector ROCK (*Rho Coiled-coil Kinase*) han sido ampliamente relacionados con la capacidad de desprendimiento del sustrato de la parte posterior de los linfocitos T migratorios y otros leucocitos <sup>(3, 251, 301)</sup>. De hecho, Rho-A ha sido implicado como un actor clave en la regulación de VLA-4 <sup>(138)</sup> y de LFA-1 <sup>(79)</sup>, modulando tanto la afinidad como la valencia de esta última en respuesta a quimioquinas, por mecanismos en los que participa la proteína quinasa C  $\zeta$  (PKC $\zeta$ ).

Rap1, otra pequeña GTPasa, ha emergido recientemente como un importante regulador de la avidéz de las integrinas LFA-1, VLA-4 y VLA-5 tanto en respuesta a quimioquinas como tras activación del TCR <sup>(121, 235, 244)</sup>. Los efectos de Rap1 en la adhesión mediada por integrinas dependen a su vez de la proteína efectora RAPL, cuya simple sobre-expresión es capaz de inducir la polarización de los linfocitos T, reclutando LFA-1 al frente de avance <sup>(123, 244)</sup>. La importancia de RAPL en la regulación de los procesos de adhesión y la consiguiente polarización y tráfico linfocitario ha sido puesta de manifiesto en ratones *knock-out* <sup>(124)</sup>. La activación de Rap1, su asociación a RAPL y la posterior activación de la quinasa Mst1, y el papel crucial de esta vía de señalización en la regulación de la adhesión y la polaridad en respuesta a quimioquinas o a estimulación antigénica ha sido ampliamente respaldada por numerosos trabajos del grupo del Dr. Kinashi <sup>(121-123)</sup>. Sin embargo, tanto la cinética como las vías de activación de Rap1 difieren según si esta se produce en respuesta a la activación del TCR o a la estimulación con quimioquinas. Así, estudios realizados en células Jurkat demostraron que mientras que la activación del TCR induce una activación sostenida de Rap1 dependiente de las vías de la fosfolipasa  $\text{C}\gamma\text{1}$  (PLC $\gamma\text{1}$ ), la estimulación con SDF-1 $\alpha$  (*Stromal cell Derived Factor 1 alpha*) promueve una activación rápida y transitoria de Rap1 independiente de dicha vía de señalización <sup>(125)</sup>.

Los ésteres de forbol (é.f), potentes activadores de la familia de serín-treonín quinasas PKC (Proteína

quinasa C), provocan profundos cambios morfológicos y son fuertes estimuladores de las adhesiones celulares mediadas por integrinas, con consecuencias en las capacidades de los linfocitos para migrar y realizar contactos célula-célula <sup>(101)</sup>. La habilidad de los inhibidores farmacológicos de PKC para romper los conjugados célula T-APC es una buena demostración del potencial de las PKC como reguladoras de los procesos de adhesión en linfocitos <sup>(187)</sup>. De hecho, la sobre-expresión de las isoformas convencionales de PKC (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, PKC $\delta$ ) activa LFA-1 <sup>(121)</sup>. Adicionalmente, varias isoformas de PKC fosforilan diversos residuos de la cola citoplasmática de la subunidad  $\beta$ 2 de las integrinas permitiendo la unión de la proteína 14-3-3 a dicha cola regulando el reclutamiento de diversas moléculas implicadas en la señalización intracelular <sup>(58)</sup>.

Además de las arriba mencionadas, otras proteínas parecen jugar un papel clave en la regulación de las integrinas en linfocitos. Un ejemplo de estas, es el caso de talina, un modulador común de la afección de las integrinas, cuya interacción con la cola citoplasmática de estas últimas regula positivamente la afinidad de las integrinas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 3 <sup>(270)</sup>. Talina, sin embargo, parece jugar un papel negativo en el reagrupamiento de las integrinas <sup>(231)</sup>. Citohesina-1, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) de ARF, interacciona con LFA-1 modulando su agrupamiento y participando en las cascadas de señalización inducidas por integrinas (señalización *outside-in*) <sup>(207)</sup>.

Por último y como expondremos más adelante, otras moléculas de adhesión como las ICAMs también son capaces de regular la actividad de las integrinas.

## **I2.2- Adhesión célula-MEC y célula-endotelio y regulación de la migración**

La velocidad de la migración celular depende de la extensión de las células hacia delante promovida por las adhesiones membrana-sustrato en el frente de avance, y suele correlacionar inversamente con la fuerza contráctil que arrastra del polo trasero hacia

delante. En definitiva, es necesario una coordinación extraordinariamente grande entre la extensión de lamelipodios en el frente de avance y la retracción en la parte posterior de la célula para que se alcancen las velocidades de migración a las que se desplazan los linfocitos. Los linfocitos T migran muy rápidamente (7-7,5 $\mu$ m/min) en comparación a los fibroblastos (1 $\mu$ m/min). Por esta razón, las interacciones entre el linfocito y la MEC son demasiado transitorias como para que se dé lugar a la formación de fibras de estrés o contactos focales <sup>(193)</sup>.

Durante la migración de los linfocitos T polarizados las integrinas se redistribuyen específicamente a distintas regiones subcelulares. Mientras la integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3 se encuentra muy concentrada en el frente de avance de los leucocitos <sup>(139)</sup>, las integrinas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 se distribuyen a lo largo de la superficie de la célula T que establece los contactos con componentes de la MEC (como fibronectina, laminina) o con el endotelio <sup>(30, 45)</sup>. Sin embargo, en modelos de migración realizados en matrices tridimensionales de colágeno tipo I, las integrinas  $\beta$ 1 (VLA-4 y VLA-5) se redistribuyen al urópodo de los linfocitos de sangre periférica <sup>(71)</sup>. También LFA-1 se reagrupa principalmente en esta estructura aunque en estados de baja afinidad, mientras que su conformación activa se presenta casi exclusivamente en las regiones medias de la célula en contacto con su ligando <sup>(252)</sup>.

Por otra parte, la activación de LFA-1 induce la migración de los linfocitos T sobre su ligando promoviendo diversas vías de señalización *outside-in*. Así, controla la red de microtúbulos mediante vías de señalización dependientes de PKC <sup>(291, 292)</sup>. A su vez, también regula la contracción del CK de actomiosina mediante la vía de la calmodulina-MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*) que controla la extensión de los lamelipodios en el frente de avance, y mediante la vía Rho-ROCK, que promueve el desprendimiento del polo trasero de las células <sup>(251)</sup>.

### **I2.3- Adhesión célula-célula; reclutamiento, activación y trans migración de los linfocitos T**

La adhesión intercelular es un proceso crucial que participa en el reclutamiento, activación y trans migración de los linfocitos T.

La inducción de una morfología polarizada en linfocitos T migratorios, con la consiguiente formación del urópodo, es un evento clave que permite la adhesión entre linfocitos T. Esta adhesión célula T-célula T, mediada principalmente por las moléculas de adhesión reagrupadas en esta estructura ICAM-1 e ICAM-3 y su contrareceptor LFA-1, ha sido postulado como un mecanismo crítico para el reclutamiento y arrastre de otros linfocitos circundantes por parte de un linfocito, favoreciendo y aumentando el número de estos que llevan a cabo la trans migración endotelial <sup>(41)</sup>.

La activación de los linfocitos T viene precedida de la formación de conjugados célula T-APC, estableciéndose gruesos contactos entre ambas células que dan origen a la formación de la SI. Dicha estructura se organiza de forma concéntrica, acumulándose el TCR en la región central o cSMAC (*central SupraMolecular Activation Cluster*) y las integrinas en la zona periférica o pSMAC (*peripheraSMAC*) <sup>(184)</sup>.

La adhesión firme de los linfocitos T al endotelio es inducida por las quimioquinas localizadas en la superficie apical de las células endoteliales y viene mediada principalmente por las integrinas LFA-1, VLA-4 y  $\alpha 4\beta 7$  <sup>(27, 83)</sup>. La diapédesis o trans migración endotelial de los linfocitos T se produce generalmente por las uniones intercelulares y las moléculas que juegan el papel principal no son integrinas sino CD31 y CD99 o JAM1 <sup>(129)</sup>.

## **I3- La molécula de adhesión intercelular ICAM-3**

ICAM-3 <sup>(39, 63, 285)</sup>, también conocida como CD50, es un miembro de la familia de moléculas de adhesión ICAM, que a su vez forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig).

### **I3.1- La familia ICAM**

La familia ICAM (Fig. I2A) consta de 5 miembros ICAM-1,-2,-3,-4,-5 que comparten numerosas características estructurales y funcionales <sup>(97)</sup>. Se trata de glicoproteínas transmembrana de tipo I con una región externa N-terminal que presenta varias repeticiones de dominios tipo inmunoglobulina C2 (Ig2), una única hélice transmembrana y una corta cola citoplásmica. Todas ellas tienen la capacidad de interactuar con miembros de la familia de las integrinas  $\beta 2$ .

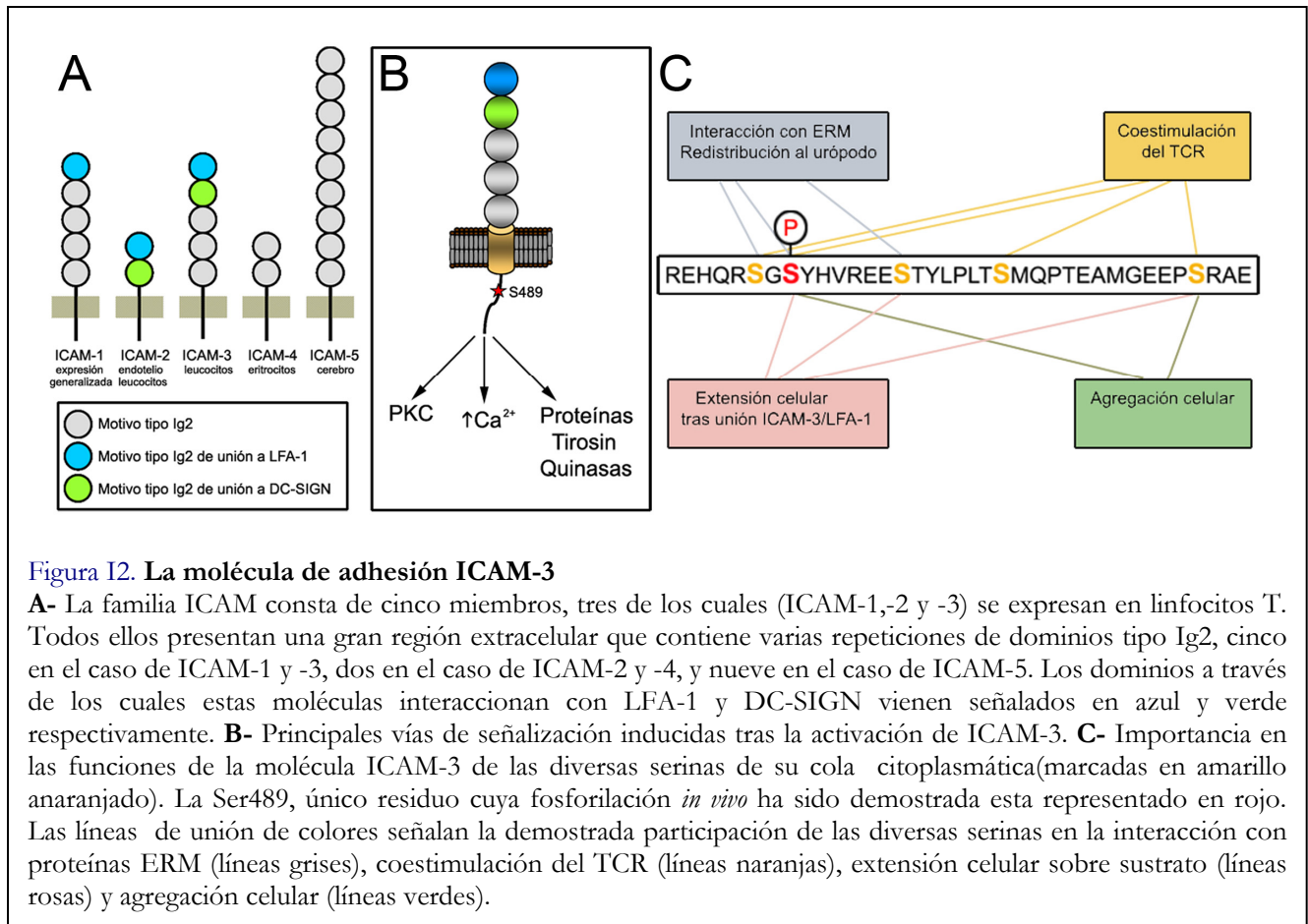
Los distintos componentes de la familia difieren, sin embargo, en su patrón de distribución y su nivel de expresión en distintas células, en su especificidad y grado de afinidad por los distintos ligandos <sup>(17)</sup>, así como en sus regiones transmembrana e intracelular que no presentan ningún tipo de homología <sup>(18)</sup>.

### **I3.2- Estructura y ligandos de ICAM-3**

La molécula de adhesión intercelular ICAM-3 es una proteína fuertemente glicosilada, que contiene 15 sitios potenciales de N-glicosilación y cuyo peso molecular oscila entre los 120kDa en linfocitos hasta los 135-160kDa en neutrófilos. Su expresión se restringe principalmente a células de origen hematopoyético estando presente en linfocitos T, células dendríticas, neutrófilos, monocitos, basófilos, macrófagos, células de Kupffer, células de Langerhans. y células endoteliales involucradas en procesos angiogénicos durante el desarrollo de tumores <sup>(33, 39, 72, 73, 93, 204, 309)</sup>.

ICAM-3 se sintetiza como un precursor de 547 residuos que comprende un péptido señal de localización en membrana. La proteína madura consta sólo de 518 aminoácidos (aa). Su región extracelular presenta 5 dominios tipo Ig2 y tras ella se encuentran la hélice transmembrana de 25 residuos y la cola citoplásmica de 37 aa que, a diferencia de las de ICAM-1 y -2, presenta numerosos residuos potencialmente fosforilables.

Varios trabajos han demostrado a su vez la presencia de una forma soluble de ICAM-3 <sup>(44, 162)</sup>, generada por ruptura proteolítica tanto en linfocitos T como en neutrófilos, que sin embargo puede permanecer



asociada a la membrana plasmática manteniendo las capacidades adhesivas de las células <sup>(44)</sup>.

Hoy en día se conocen cuatro ligandos para ICAM-3, las integrinas  $\alpha\text{L}\beta 2$  (LFA-1),  $\alpha\text{M}\beta 2$  (Mac-1) y  $\alpha\text{D}\beta 2$ , así como la molécula recientemente descubierta DC-SIGN (*DC-Specific ICAM-Grabbing Non integrin*), un receptor de la familia de las lectinas tipo-C que se expresa exclusivamente en células dendríticas <sup>(18)</sup>. Por su relevancia funcional los más estudiados han sido DC-SIGN y LFA-1. Tanto el sitio de unión como la afinidad de ICAM-3 por cada uno de ellos son muy distintos (Fig. I2A). DC-SIGN se une a través del segundo dominio tipo Ig2 y presenta una alta afinidad por ICAM-3, siendo este su principal ligando aunque también puede unirse a ICAM-2. LFA-1, molécula clave en las interacciones inmunes, cuya expresión se restringe a leucocitos, puede unirse a ICAM-1,-2 y 3, haciéndolo en todos los casos a través del primer dominio tipo Ig2 y presentando por el contrario una

baja afinidad por ICAM-3 en comparación a los otros dos miembros de la familia.

La generación de una gran batería de anticuerpos (Ac) contra múltiples epítomos de la región extracelular de ICAM-3 por diversos laboratorios y el detallado conocimiento obtenido acerca de su sitio de unión a LFA-1 <sup>(21, 131)</sup> ha permitido el uso de varios de estos Ac para el estudio tanto de los efectos funcionales como de las rutas de señalización promovidos por la interacción de ICAM-3 con su ligando.

### I3.3- Relevancia funcional e inducción de rutas de señalización a través de ICAM-3

Los leucocitos expresan ICAM-1, -2 y -3, sin embargo solo ICAM-3 presenta niveles elevados en estado de reposo. Este hecho inicialmente observado al identificarse la proteína <sup>(63, 285)</sup> sugirió ya desde un principio su implicación en los estadios iniciales de la respuesta inmune <sup>(38, 39, 63)</sup>. La importancia de ICAM-3

en el establecimiento inicial de interacciones célula T-APC y la consiguiente activación de los linfocitos T ha sido refrendada en distintos trabajos donde el pre-tratamiento de las células con Ac anti-ICAM-3 provocaba la inhibición de la formación de conjugados célula T-APC y reducía fuertemente la proliferación de células T en cultivos mixtos con células dendríticas estimuladas <sup>(84, 93, 259)</sup>. Posteriormente, un trabajo realizado por el grupo del Dr. Sánchez Madrid, demostró la rápida re-localización de ICAM-3 desde la parte posterior de las células T a la zona de contacto con la APC, demostrando el papel clave jugado por esta molécula en los contactos exploratorios iniciales llevados a cabo por el linfocito T en búsqueda del complejo Ag-MHC en la superficie de las APC <sup>(185)</sup>.

ICAM-3 ha sido también caracterizada como molécula señalizadora, regulando los procesos de adhesión y activación de los linfocitos T <sup>(42)</sup>. Estudios realizados con el Ac pro-agregatorio anti-ICAM-3 HP2/19 en linfoblastos primarios demostraron la implicación de ICAM-3 favoreciendo las interacciones célula-célula mediadas por LFA-1/ICAM-1 <sup>(29)</sup>, así como en las interacciones mediadas por integrinas  $\beta 1$  tanto con la MEC como con las células endoteliales <sup>(30, 32)</sup>. Dicho Ac también es capaz de inducir la polarización de los linfoblastos primarios, demostrando a su vez la implicación de ICAM-3 en la regulación de la morfología celular de los linfocitos <sup>(30)</sup>.

Adicionalmente, se ha descrito ampliamente a ICAM-3 como una molécula co-estimuladora en linfocitos T en reposo o activados <sup>(100)</sup>, y en otros tipos celulares implicados en la respuesta inmune <sup>(309)</sup>. Estos y otros trabajos demostraron que en presencia de concentraciones sub-óptimas de Ac anti-TCR, la estimulación de ICAM-3 promueve la expresión de múltiples marcadores celulares de activación como CD25 y CD69, así como la secreción de interleukina-2 (IL-2) por los linfocitos T <sup>(98, 100)</sup>. De idéntica manera, la co-estimulación con Ac anti-Fc $\gamma$ R y Ac anti-ICAM-3 estimula la secreción de diversas quimioquinas en monocitos y neutrófilos <sup>(128)</sup>.

Diversos trabajos se han adentrado en la señalización *outside-in* inducida a través de ICAM-3 (Fig. I2B). Algunos de ellos han señalado la implicación de tirosin quinasas, destacando la participación de lck y fyn <sup>(119)</sup> en estas cascadas de señalización intracelulares inducidas por ICAM-3 tanto en linfocitos <sup>(11)</sup> como en neutrófilos <sup>(249)</sup>. La señalización a través de ICAM-3 también promueve aumentos en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> <sup>(119)</sup>. A su vez un estudio realizado en neutrófilos con un Ac anti-ICAM-3 promotor de la adhesión celular ha demostrado que los efectos observados no se deben a aumentos en la expresión de integrinas sino a la regulación de la activación de estas últimas así como al reordenamiento del CK mediante rutas de señalización intracelular que implican la participación de proteínas tirosín-quinasa y de PKC <sup>(64)</sup>.

La participación de las vías de PKC en los efectos mediados por ICAM-3 también ha sido sugerida en células Jurkat mediante el uso de inhibidores farmacológicos de dichas quinasas que bloquean la formación de extensiones celulares sobre superficies recubiertas con Ac anti-ICAM-3 <sup>(98)</sup>.

### **I3.4- La importancia del dominio citoplasmático de ICAM-3 y su fosforilación**

El dominio citoplasmático de ICAM-3 presenta una alta concentración de serinas y treoninas susceptibles de ser fosforiladas (8 de los 37 residuos) (Fig. I2C) a diferencia del bajo contenido de estas en dicha región de los otros dos miembros de la familia ICAM-1 y -2 (con 3 y 1, respectivamente). Un estudio funcional de este dominio citoplasmático ha evidenciado la importancia de las distintas serinas presentes en esta región en las diversas funciones desarrolladas por ICAM-3 en linfocitos T, tales como la co-estimulación del TCR, la agregación celular homotípica y la promoción de extensiones celulares al interactuar con su ligando <sup>(98)</sup>. Este trabajo sugiere que la fosforilación de distintos residuos dentro de la secuencia citoplasmática de ICAM-3 puede regular



estos procesos e identificó la Ser489 como un sitio de fosforilación de la molécula *in vivo* tras la estimulación del TCR y en respuesta a é.f.

Otro trabajo posterior analizó a su vez la participación de las diversas serinas de la cola citoplasmática de ICAM-3 en la regulación de la interacción de esta con la familia de proteínas ERM, y el consiguiente efecto sobre su redistribución al urópodo. Estos estudios demostraron la importancia de varios residuos, entre los cuales destacan las serinas 487, 489 y 496, en la polarización de ICAM-3 en linfocitos <sup>(240)</sup>.

Dos trabajos han relacionado las vías de PKC con la fosforilación *in vivo* de ICAM-3 mediante el uso de inhibidores farmacológicos <sup>(98, 147)</sup>. Además, PKC $\theta$  es capaz de fosforilar *in vitro* el dominio citoplásmico de ICAM-3 <sup>(98)</sup>. Sin embargo, en la actualidad se desconoce aún la/las quinasa/s responsable/s de la fosforilación *in vivo* de esta molécula de adhesión.

#### 14- Las quimioquinas

Las quimioquinas, citoquinas quimioatrayentes, son pequeñas proteínas secretadas por leucocitos u otras células en respuesta a diferentes estímulos, que inducen la quimiotaxis, promueven la polarización y regulan las capacidades adhesivas de los distintos tipos de leucocitos <sup>(155, 298)</sup>. Además de su papel como reguladores de la migración leucocitaria, también están involucradas en otros procesos biológicos tales como la angiogénesis, la morfogénesis tisular, la hematopoyesis, el crecimiento tumoral y la infección de las células T CD4<sup>+</sup> por el VIH <sup>(155, 298)</sup>.

El gran interés despertado por estas moléculas en el campo de la inmunología se explica por los numerosos aspectos de la inmunidad innata y adquirida íntimamente relacionados con el tráfico leucocitario. Así las quimioquinas pro-inflamatorias controlan el reclutamiento de los leucocitos efectores a los tejidos infectados, dañados o tumorigénicos, mientras que las quimioquinas homeostáticas regulan la recirculación o “*homing*” de los leucocitos durante la hematopoyesis, la iniciación de la respuesta inmune en los tejidos

linfoides secundarios y la vigilancia inmune en los tejidos periféricos sanos. Una misma quimioquina puede realizar ambas funciones, y la compleja regulación del tráfico leucocitario parece depender de la combinación de receptores de quimioquinas (CKR) expresados por cada tipo celular en cada situación, existiendo numerosos casos de distintas quimioquinas que señalizan a través de un mismo receptor. A su vez una misma quimioquina puede unirse a distintos CKR funcionando como agonista o antagonista <sup>(188)</sup>.

Las quimioquinas se dividen en cuatro subfamilias (CXC, CC, C, CX3C) en base a sus propiedades estructurales y a su secuencia primaria aminoacídica. Todas ellas se unen y señalizan a través de receptores de siete hélices transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR). La activación de los CKR induce diversas rutas de señalización intracelular entre las que se encuentran las cascadas de señalización de PI3K, PLC/PKC, la familia de GTPasas de Ras, de Rho, Rap1, los aumentos de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la activación sostenida de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). Estas vías conducen, entre otros efectos, a la activación de integrinas y al establecimiento de la polaridad celular <sup>(129)</sup>. La redistribución al frente de avance de los CKR, y la activación y re-localización de los distintos receptores implicados en la adhesión celular son procesos clave que controlan la extravasación y migración de los linfocitos a través de tejidos, asegurando a su vez la direccionalidad del movimiento al promover la restricción espacial de la activación de las cascadas de transducción de señales.

Las quimioquinas no solo establecen uniones de alta afinidad con receptores GPCR sino que también pueden realizar interacciones de baja afinidad con proteoglicanos. En los últimos años se ha demostrado la importancia funcional *in vivo* de esta unión, permitiendo la retención de las quimioquinas en la superficie celular facilitando la formación de gradientes <sup>(88)</sup>. De hecho, observaciones publicadas recientemente demuestran que la adhesión firme de los linfocitos sobre la pared de los vasos, un paso fundamental en la

extravasación linfocitaria, requiere de la inmovilización de las quimioquinas en la superficie del endotelio <sup>(241)</sup>.

#### 14.1-La quimioquina SDF-1 $\alpha$

CXCL12 o SDF-1 $\alpha$  (*Stromal cell Derived Factor 1  $\alpha$* ) es una citoquina con una alta capacidad como factor quimiotáctico para células T, pre y pro-B, monocitos, células dendríticas y células progenitoras hematopoyéticas <sup>(13)</sup>.

SDF-1 $\alpha$  se une y señala a través del receptor CXCR4, siendo este el único CKR de expresión ubicua presente tanto en los precursores como en todos los leucocitos maduros, señalando el importante papel de esta quimioquina en el desarrollo, homeostasis y respuesta inflamatoria de los linfocitos T y demás integrantes de la respuesta inmune.

Como el resto de CKR, CXCR4 es un GPCR cuyas vías principales de transducción de señales implican a la proteína Gi <sup>(273)</sup>, aunque también puede promover efectos a través de otras proteínas G (G12/13 o Gq/11) o asociándose al TCR utilizando los dominios ITAM de este último para reclutar distintas moléculas transductoras de señal <sup>(135)</sup>. CXCR4 ha sido recientemente descrito como una molécula co-estimuladora, cuyo reclutamiento a la SI durante la activación del linfocito T requiere de la secreción de quimioquinas por la APC <sup>(183)</sup>. Sin embargo, la activación del TCR por el reconocimiento del complejo péptido-MHC presentado por la APC se asocia con una incapacidad transitoria de los linfocitos para responder a estímulos quimiotácticos <sup>(53, 54)</sup>. Esto podría deberse al cambio de proteína G asociada a los CKR, mientras que en linfocitos migratorios la asociada en el frente de avance con CCR5 y CXCR4 es Gi señalizando quimiotaxis, en la SI de los conjugados célulaT-APC es Gq/11 que parece estar implicada en la adhesión celular y la activación de los linfocitos T <sup>(177)</sup>. Estudios previos realizados en linfocitos T y B, han relacionado la disminución de la quimiotaxis frente a SDF-1 $\alpha$  tras la estimulación de los receptores de Ag

con la internalización de CXCR4 mediada por PKC <sup>(86, 205)</sup>.

De forma similar a lo observado para otros GPCR en otros tipos celulares, la estimulación con SDF-1 $\alpha$  de los linfocitos T promueve la internalización de CXCR4 <sup>(246)</sup>, un mecanismo que ha sido generalmente asociado a la desensitización del receptor y cuya ruta principal es la endocitosis mediada por clatrina promovida por la fosforilación del receptor por GRKs (*G protein-coupled Receptor Kinase*). Sin embargo, en otros modelos celulares, la internalización de CXCR4 en respuesta a SDF-1 $\alpha$  ha sido involucrada en la quimiotaxis de las células en respuesta a dicho factor <sup>(50, 153)</sup>. Así diversas publicaciones han demostrado que la inhibición de la internalización de los CKR en respuesta a quimioquinas provoca una disminución de la quimiotaxis <sup>(50, 61, 153, 304)</sup>, sugiriendo una conexión entre el tráfico vesicular de membranas y la quimiotaxis.

CXCR4 ha sido ampliamente estudiado al ser este un co-receptor del VIH <sup>(65)</sup> y dado que la estimulación con SDF-1 $\alpha$  bloquea la entrada del virus en los linfocitos T <sup>(19, 196)</sup>. Además de su papel en el sistema inmune, la señalización a través de SDF-1 $\alpha$  y CXCR4 juega un importante papel en el desarrollo del sistema nervioso central <sup>(277)</sup>, así como en los procesos de vascularización <sup>(269)</sup> y crecimiento y metástasis tumoral <sup>(25, 197)</sup>.

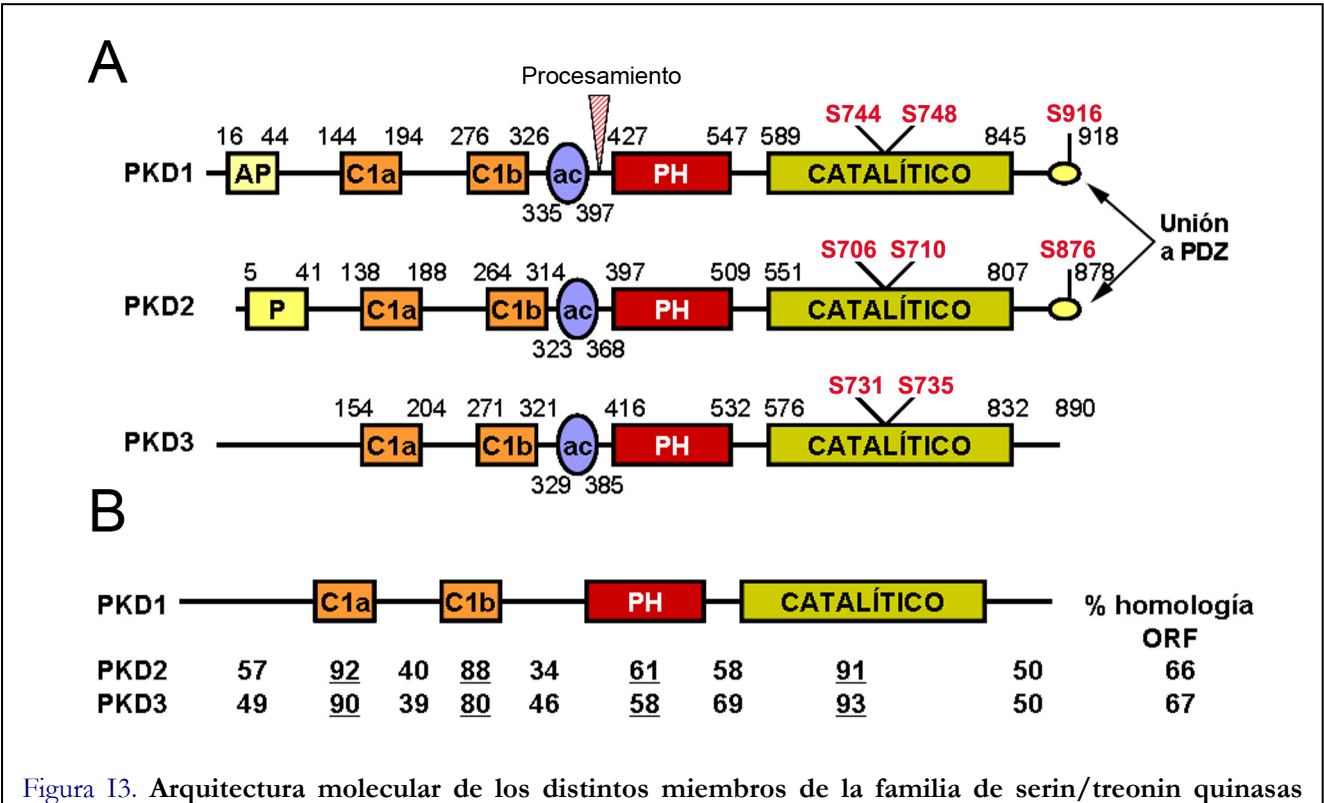
De forma significativa, solo SDF-1 $\alpha$ , y ninguna otra quimioquina, señala a través de CXCR4. Este hecho unido a la enorme similitud fenotípica de los ratones *knock-out* para SDF-1 $\alpha$  y CXCR4, que presentan en ambos casos profundos defectos en el desarrollo hematopoyético y cerebelar muriendo en estadios perinatales, hicieron pensar durante bastante tiempo que los efectos mediados por esta quimioquina venían mediados exclusivamente a través de CXCR4 <sup>(156, 310)</sup>. Trabajos recientes han demostrado sin embargo que SDF-1 $\alpha$  también señala a través del receptor huérfano RCD1, rebautizado como CXCR7 <sup>(15, 26)</sup>. En linfocitos T, la estimulación con SDF-1 $\alpha$  también promueve la quimiotaxis a través de este receptor <sup>(15)</sup>.

## I5- La proteína quinasa D

La proteína quinasa D (PKD) es una familia de serín-treonín quinasas clasificada recientemente como un subgrupo de la superfamilia de la quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CaMK) dado el grado de homología de su dominio catalítico<sup>(89, 159)</sup>. La familia de PKD consta de tres miembros: PKD1 (que incluye la PKD de ratón así como su homólogo humano inicialmente denominado PKC $\mu$ )<sup>(118, 280)</sup>, PKD2<sup>(266)</sup> y PKD3, también llamada PKCv<sup>(96)</sup>.

Las tres isoformas presentan una estructura modular similar con una región N-terminal reguladora que contiene un dominio rico en cisteínas o CRD (*Cysteine Rich Domain*), una región rica en aa cargados negativamente y un dominio de homología a pleckstrina (PH) tras el cual se encuentra el dominio catalítico C-terminal. El grado de homología de las tres isoformas es muy elevado, siendo el dominio catalítico prácticamente idéntico, con más de un 90% de identidad de secuencia. A pesar de ello existen diferencias entre las tres (Fig. I3), así PKD1 y PKD2 presentan una región apolar en el extremo N-terminal

### I5.1- Estructura



**Figura I3. Arquitectura molecular de los distintos miembros de la familia de serín/treonín quinasas PKD.**

**A-** La familia PKD consta de tres miembros que presentan una estructura modular común. El dominio regulador N-terminal presenta en los tres casos un tandem de motivos similares a dedos de zinc ricos en cisteínas (C1a y C1b), un dominio ácido (ac) y un dominio de homología a pleckstrina (PH). También puede encontrarse un dominio rico en alaninas y prolinas (AP) o rico en prolinas (P) en los extremos N-terminal de PKD1 y PKD2 respectivamente. En la región C-terminal se encuentra el dominio catalítico, que en el caso de las isoformas PKD1 y 2, va seguido de un motivo de unión a proteínas PDZ de tipo I. Las tres isoformas presentan dos residuos de activación por fosforilación por PKCs en el lazo de activación del dominio catalítico. PKD1 y 2 presentan a su vez un sitio de autofosforilación en el motivo de unión a proteínas PDZ ausente en el caso de PKD3. Los números indican la posición en la secuencia aminoacídica. **B-** PKD1, 2 y 3 presentan un elevado grado de homología. Los números indican el porcentaje de identidad de las secuencias aminoacídicas de PKD2 y 3 con respecto a PKD1. Nótese la enorme similitud de todos los módulos reguladores así como del dominio catalítico de las tres isoformas.



no presente en PKD3. Más relevante es la presencia de un motivo de unión a dominios PDZ (*Postsynaptic density-95/Disc large/Zonula occludens-1*) con una serina susceptible de auto/trans-fosforilación por la quinasa una vez activa en el extremo C-terminal de PKD1 y 2, ausente en el caso de PKD3<sup>(172, 233)</sup>. De forma general, las regiones menos conservadas a nivel de secuencia se encuentran en las zonas entre dominios, pudiendo ser estas, así como la distribución diferencial, las que confieran una especificidad de función a cada isoforma más que la especificidad de sustrato. Hasta la fecha de hoy, PKD1 ha sido el miembro más estudiado y mejor caracterizado de la familia, por ser el primero que se identificó. De aquí en adelante nos referiremos a esta isoforma como PKD.

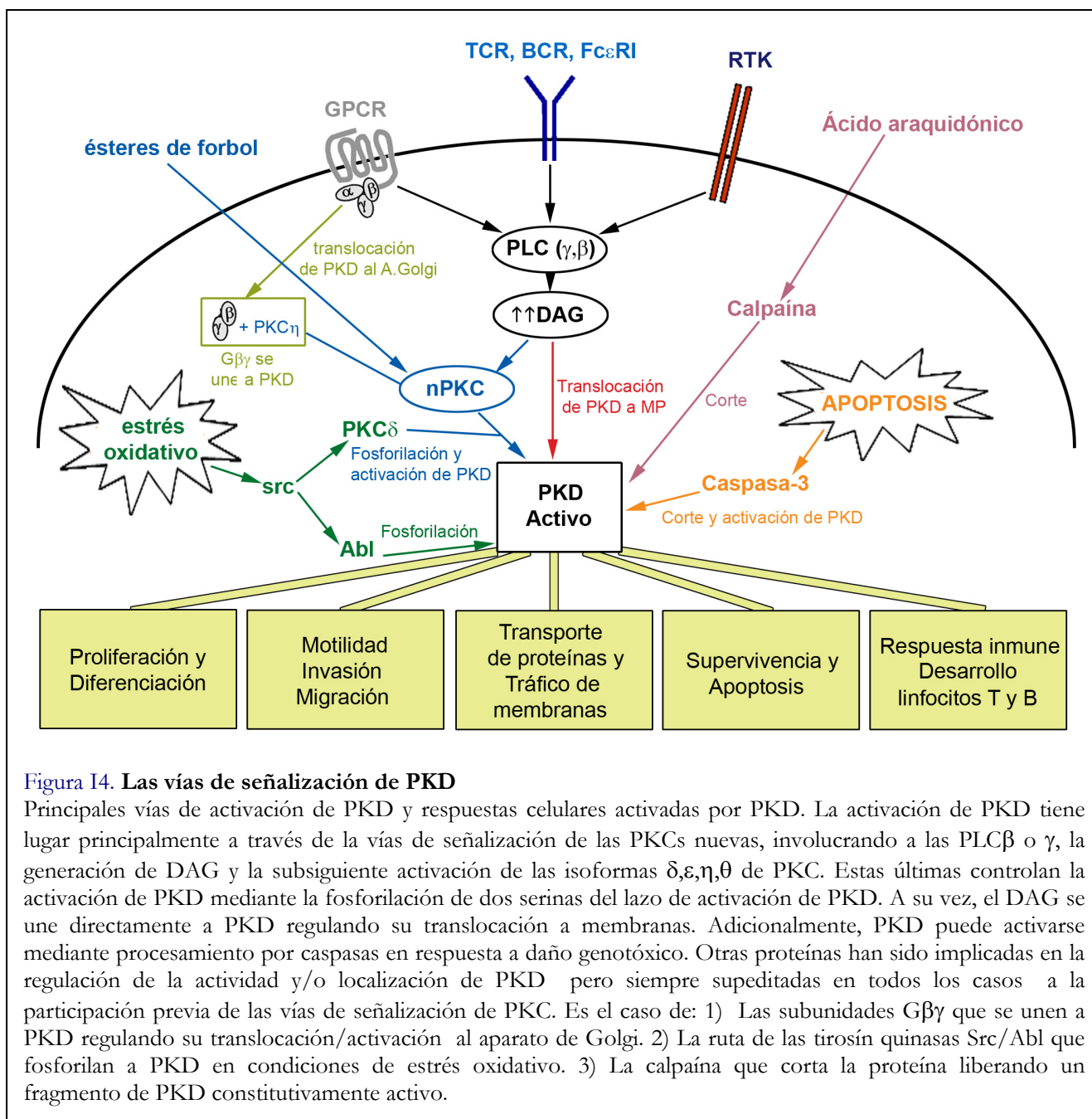
De forma basal PKD presenta muy bajos niveles de activación<sup>(283)</sup>, al ejercer el dominio regulador un efecto auto-inhibitorio sobre su actividad quinasa, su delección provoca la plena activación del enzima<sup>(287)</sup>. De forma más detallada otros autores han desentrañado el papel auto-inhibitorio jugado por el dominio CRD<sup>(108)</sup> así como por el dominio PH<sup>(109)</sup>. El dominio CRD está constituido por una repetición en tandem de motivos similares a dedos de zinc ricos en cisteínas denominados C1a y C1b. El diacilglicerol (DAG), así como los é.f se unen a PKD por los motivos C1a y C1b. La unión de DAG a los dominios C1 promueve cambios de localización, así mientras el dominio C1a es necesario para la translocación del enzima al aparato de Golgi<sup>(157)</sup>, C1b es requerido para su translocación a la membrana plasmática<sup>(217)</sup>. PKD también puede unirse a G $\alpha$ q a través de C1b<sup>(195)</sup>. A su vez el dominio PH es necesario para la salida de PKD del núcleo<sup>(169, 216)</sup> y sirve de sitio de anclaje para las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de las proteínas G (G $\beta\gamma$ )<sup>(116)</sup>.

### 15.2- Rutas de activación y funciones principales

PKD ocupa un lugar privilegiado en las cascadas de señalización iniciadas por el DAG al ser un efector común de las isoformas nuevas de la familia de PKC. Su principal ruta de activación implica la unión de PKC

a su dominio PH<sup>(294)</sup> y la fosforilación por esta familia de quinasas de dos serinas de su lazo de activación<sup>(110, 311)</sup>. Por lo tanto, el DAG regula a PKD de dos formas diferentes; directamente influenciando su localización intracelular<sup>(166)</sup> e indirectamente activando PKC que controla su activación por fosforilación<sup>(110, 296)</sup> (Fig. I4). Así en respuesta a diversos estímulos, tales como factores de crecimiento, agonistas de GPCR o el reconocimiento antigénico por la Ig E, el BCR o el TCR, la activación de PLC $\beta$  o  $\gamma$  provoca la acumulación de DAG que activa las distintas isoformas nuevas de PKC (PKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  o  $\theta$ ) susceptibles de fosforilar y activar a PKD<sup>(263, 294, 307, 311)</sup> (revisado en 282, 297). La activación directa de PKC con é.f, análogos de DAG, permeables a la membrana plasmática o con pequeños péptidos como briostatina también induce una potente activación de PKD. Esta vía de activación de PKD dependiente de PKC ha sido descrita en multitud de tipos celulares distintos entre los cuales se incluyen los fibroblastos, las células epiteliales de riñón e intestino, las células de músculo liso, las neuronas, los osteoblastos, una gran variedad de células cancerosas, las plaquetas, los mastocitos y los linfocitos T y B<sup>(2, 85, 95, 107, 143, 166, 171, 173, 178, 200, 217, 245, 257)</sup>. Aunque en la mayoría de los casos descritos hasta el día de hoy la activación de PKD implica la participación de PKC, se han postulado diversas rutas de activación de PKD independientes de PKC. Así la fosforilación en la Tyr463 del dominio PH a través de Src-Abl fue inicialmente descrita como una vía alternativa de activación de PKD por estrés oxidativo<sup>(261)</sup> aunque trabajos posteriores han demostrado claramente que fosforilación no es suficiente para activar la proteína<sup>(178, 262, 263)</sup>.

Por otro lado, varios estudios han desentrañado un mecanismo alternativo de activación de PKD en condiciones apoptóticas, mediante su proteólisis por caspasa-3 u otras caspasas efectoras liberando diversos fragmentos constitutivamente activos de la proteína<sup>(56, 284)</sup>. La presencia de varios sitios de corte para caspasas entre el motivo C1b y el dominio PH y la alta



conservación de estas secuencias parece indicar que este mecanismo alternativo de activación está conservado entre especies. En un contexto completamente diferente, aunque supeditado a la activación previa por PKC, otro trabajo ha demostrado que la proteólisis por calpaína de PKD también afecta a su función <sup>(127)</sup>.

En situación basal PKD es principalmente citosólica encontrándose también asociada al aparato de Golgi <sup>(145, 209)</sup> o a las mitocondrias <sup>(260, 264)</sup> en algunos tipos

celulares. Sin embargo, una característica fundamental de PKD es su dinámica redistribución tras su activación pudiendo translocarse de forma sostenida o transitoria a la membrana plasmática regresando posteriormente al citosol, a compartimentos de membrana o incluso translocándose al núcleo, dependiendo del estímulo y del tipo celular. PKD es por tanto un buen candidato en la propagación de señales de la superficie al interior celular, regulando distintos eventos en la membrana plasmática, en

compartimentos internos de membrana, en el citoplasma o en el núcleo <sup>(228, 297)</sup>.

PKD ha sido implicada en diversos procesos biológicos tales como la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis, la invasión tumoral, la regulación del tráfico anterógrado de proteínas desde el trans-Golgi a la membrana plasmática. De forma interesante, esta quinasa también está relacionada con la biología de los linfocitos T y B así como con procesos de adhesión y motilidad regulados por integrinas (revisado en 282, 297).

### 15.3- Implicaciones de PKD en el sistema inmune

Es un hecho aceptado que el eje DAG-PKC juega un papel central en la transducción de señales involucradas en la respuesta inmune en mamíferos, regulando una gran cantidad de programas de transcripción génica, modulando la activación de las integrinas y participando en la respuesta a quimioquinas y al receptor de Ag <sup>(255)</sup>. La acción del DAG sobre las PKC clásicas y nuevas es directa, uniéndose a estas a través de sus dominios CRD, y dando lugar a cambios conformacionales que permiten tanto su re-localización a membranas como su activación. Sin embargo, existen otras proteínas que presentan estos dominios CRD, pudiendo ser dianas del DAG generado en las células, como son las quimerinas, familia de GAPs (proteínas activadoras de la actividad GTPasa) de Rac <sup>(126)</sup>; la familia GRP, factores intercambiadores de nucleótidos de Ras <sup>(55)</sup>; la familia de DAG quinasas, DGK <sup>(152)</sup>; y la familia de serín-treonín quinasas PKD <sup>(229)</sup>. Estas tres últimas-GRP, DGK y PKD- aún uniendo directamente DAG, son efectores de PKC y necesitan la participación de estas para su activación <sup>(150, 151, 272, 295, 311)</sup>.

Los linfocitos T y B así como los mastocitos coexpresan las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\lambda$   $\theta$  y  $\zeta$  de PKC. En linfocitos T se piensa que PKC  $\theta$  es la que juega un papel más prominente por su abundancia y por ser la única que se relocaliza en el cSMAC al establecerse la SI. Sin embargo, la ausencia de grandes defectos en los

linfocitos T de ratones *knock-out* deficientes en PKC  $\theta$  <sup>(267)</sup> o en otras isoformas, así como la gran similitud de los dominios catalíticos de las distintas PKC llevan a pensar en la existencia de cierta redundancia funcional entre las isoformas de esta familia <sup>(255, 271)</sup>.

PKD presenta una elevada expresión en células hematopoyéticas <sup>(118)</sup>, siendo un punto de convergencia de la señalización mediada por PKC implicado en las cascadas de transducción de señales de los receptores de Ag de las células T y B y del receptor de la IgE (Fc $\epsilon$ R1) de los mastocitos <sup>(173, 245)</sup>. En situación basal, PKD presenta una localización citoplasmática en linfocitos. Tras la estimulación del TCR o del BCR PKD sufre una activación sostenida, relocalizando rápida y transitoriamente a la membrana plasmática para regresar posteriormente en su forma activa al citosol <sup>(169)</sup>. Posteriores trabajos han profundizado en el estudio de la distribución subcelular de PKD en linfocitos T demostrando tanto la importancia en su función <sup>(160, 189)</sup> como la dependencia de DAG de este proceso <sup>(299)</sup>. Así, en conjugados célula T-APC, la generación localizada de DAG en la zona de contacto entre ambas células permite la acumulación transitoria de PKD en la SI en formación <sup>(256)</sup>. Esta redistribución y activación de PKD en respuesta a Ag permite la fosforilación y plena activación de HPK1 que promueve la señalización vía SAPK/JNK y el factor de transcripción NF $\kappa$ B. Estas rutas de señalización determinan la supervivencia o muerte de los linfocitos en desarrollo así como la promoción de importantes señales coestimuladoras en células T <sup>(10)</sup>. De forma interesante, PKD ha sido implicada como un actor clave en el tráfico intracelular de vesículas desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática <sup>(145)</sup>. Por otro lado, HPK1 participa en un complejo de señalización que regula la endocitosis del TCR basal o mediada por Ag <sup>(140)</sup>. Estas evidencias sugieren que ambas quinasas podrían estar involucradas en la finalización de la señalización inducida por el TCR. De acuerdo con esto, PKD ha sido implicada en una ruta

de retroalimentación negativa de la señalización inducida por el BCR en linfocitos B <sup>(245)</sup>.

Diversos estudios han demostrado el importante papel desarrollado por PKD en la diferenciación y proliferación de los timocitos. Un trabajo realizado con ratones transgénicos ha demostrado que la sobre-expresión de una isoforma citosólica y constitutivamente activa de PKD reduce dramáticamente la cantidad de timocitos doble positivos CD4+CD8+ y simple positivos, suprimiendo a su vez el reordenamiento de la cadena  $\beta$  del TCR <sup>(160)</sup>. Otros trabajos han demostrado la participación de PKD en el establecimiento de la tolerancia, jugando un papel crucial en la selección negativa de los timocitos. Así, tras la estimulación antigénica del TCR, PKD se activa y estimula el exporte nuclear de la histona deacetilasa 7 (HDAC7) mediante la fosforilación de cuatro serinas de su región N-terminal. De este modo se desreprime la expresión de Nur77, provocando la apoptosis de los linfocitos CD4+CD8+ que reconocen péptidos propios <sup>(48, 202)</sup>. Un trabajo posterior ha refrendado a su vez la participación de PKD en el control de la expresión génica tras la estimulación del BCR, demostrando que la regulación de la accesibilidad de la cromatina vía las HDAC de clase II es un proceso común de linfocitos T y B <sup>(170)</sup>. A su vez dicho estudio demostraba la existencia de una redundancia funcional de las isoformas PKD1 y PKD3 en este proceso. Por otra parte la regulación de proteínas nucleares como las HDAC por PKD implica que, bajo determinadas condiciones, esta quinasa activa puede encontrarse en el núcleo de los linfocitos T y B de idéntica manera a lo descrito en otros tipos celulares en respuesta a la estimulación de GPCR o a estrés oxidativo <sup>(216, 219)</sup>.

#### **15.4- Función de PKD en los procesos de adhesión y migración**

Durante los últimos años diversos trabajos han relacionado la actividad de PKD con procesos de adhesión, migración celular y regulación de integrinas.

La participación de PKD en los procesos de adhesión celular a componentes de la MEC fue inicialmente estudiada en células de cáncer de mama. En dichas células PKD co-localiza e interacciona con cortactina y paxilina en los invadopodios, protuberancias de membrana asociadas a degradación de MEC y relacionadas con procesos de invasión tumoral <sup>(22)</sup>. Estudios posteriores en estas mismas células han determinado la participación de PKD en la adhesión a colágeno de tipo IV mediada por integrinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta 1$  promovida por ácidos grasos poli-insaturados. Estos trabajos demostraron en este modelo de adhesión célula-MEC que PKD se activa, se transloca y sufre una proteólisis por calpaína dando lugar a una forma truncada constitutivamente activa <sup>(127, 199)</sup>. También se ha descubierto la implicación de PKD en procesos de adhesión célula-célula dependientes de caderinas en células tumorales de cáncer de próstata <sup>(115)</sup>.

Varios trabajos han implicado a PKD en los procesos de motilidad celular. Así, la sobre-expresión de PKD inhibe la migración en células de cáncer de próstata <sup>(115)</sup>. Por el contrario, en fibroblastos, la actividad de PKD parece crucial para la locomoción. Esto se debe a que esta quinasa controla la distribución de Rac-1 al frente de avance mediante la regulación del tráfico anterógrado de membranas <sup>(210)</sup> y el reciclaje de la integrina  $\alpha v \beta 3$  a los contactos focales nacientes <sup>(300)</sup>. De forma similar, la actividad de PKD también es crítica para la migración celular de células endoteliales y la consiguiente angiogénesis promovida por VEGF <sup>(211)</sup>. Tanto en fibroblastos como en células endoteliales, los ensayos de ARN de interferencia (ARNi) demostraron que la supresión de la expresión de PKD inhibe la motilidad celular <sup>(211, 300)</sup>.

Algunos de los trabajos anteriormente mencionados han establecido una relación entre la actividad de PKD y la regulación de integrinas <sup>(199, 300)</sup>. En este mismo orden de cosas, la reciente aparición de un estudio que demuestra la implicación de PKD1 en la activación de las integrinas  $\beta 1$  a través del control de la actividad y la

localización de Rap1 en linfocitos T ha supuesto todo un hito <sup>(176)</sup>. Estos resultados y el conocido papel de Rap1 como actor clave en los procesos de polarización y migración en respuesta a estímulos quimiotácticos, hace sospechar de la posible participación de PKD en la motilidad de los linfocitos <sup>(176)</sup>.

## I6- Kidins220

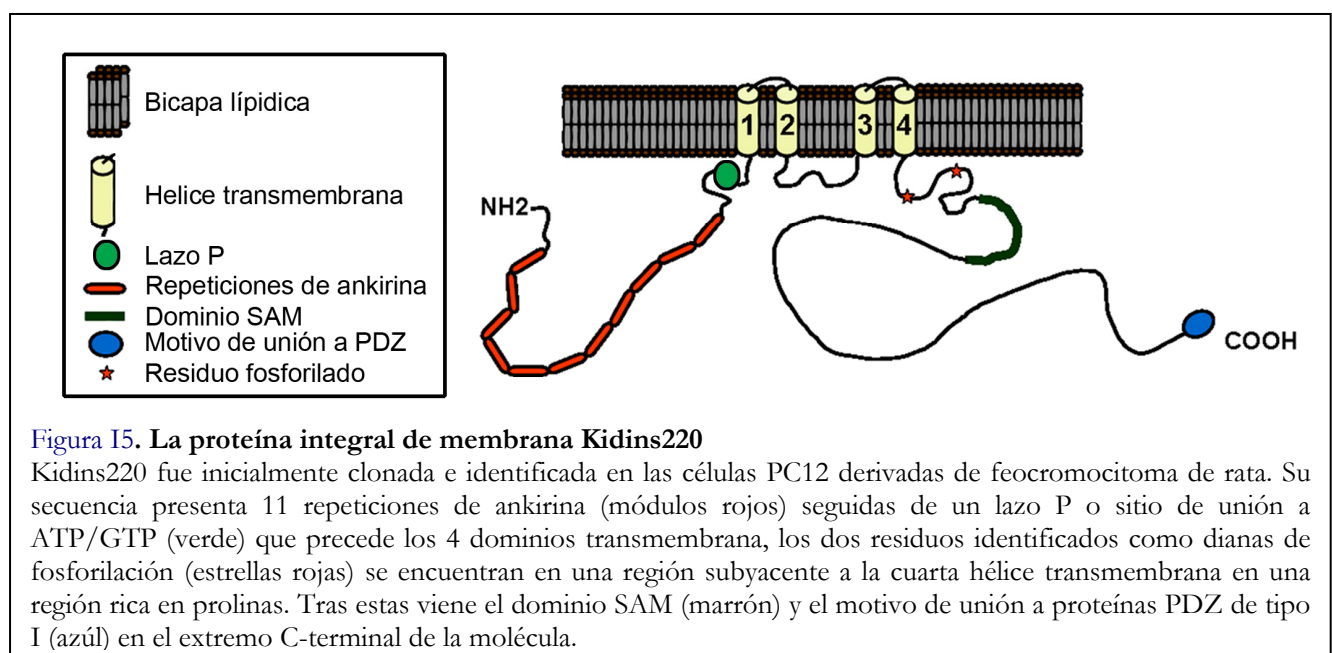
Kidins220 (*Kinase D-interacting substrate of 220 kDa*), también conocida como ARMS (*Ankyrin-Rich Membrane Spanning*) es una proteína integral de membrana identificada recientemente como primer sustrato fisiológico de PKD1 <sup>(107)</sup> cuya expresión en un principio fue detectada y circunscrita principalmente a células y tejidos de origen nervioso y neuroectodérmico <sup>(107, 132)</sup>.

### I6.1- Estructura

Kidins220 es una proteína de gran tamaño (1763 aa) anclada a membranas lipídicas a través de cuatro dominios transmembrana y cuyos extremos N- y C-terminal se encuentran expuestos al citoplasma. Su secuencia primaria puede subdividirse en varios dominios (Fig. I5). La región N-terminal presenta once repeticiones de ankirina, las cuales han sido observadas en numerosas proteínas y están involucradas en el

establecimiento de conexiones membrana-CK, así como en diversas interacciones proteína-proteína <sup>(20, 236)</sup>. Tras las repeticiones de ankirina encontramos una secuencia consenso de unión a ATP/GTP o lazo-P (AQWGSGKS) de los residuos 467 a 474, seguida de los cuatro dominios transmembrana. Las características de las  $\alpha$ -hélices transmembrana, que presentan un lado hidrofílico y otro hidrofóbico, y su topología, hacen pensar que Kidins220 pudiera formar un poro o canal en la membrana plasmática. En su larga cola C-terminal intracelular, Kidins220 presenta una región rica en prolinas, recientemente implicada en el anclaje de diversos módulos proteicos como los dominios SH2 o SH3 <sup>(8)</sup>. A continuación, existe un dominio SAM (*Sterile- $\alpha$ -Motif*) y un motivo de unión a proteínas PDZ de tipo I en el extremo C-terminal de gran importancia para la localización subcelular de la proteína <sup>(154, 233)</sup>.

Esta región C-terminal de la proteína presenta numerosos residuos de serina, treonina y tirosina que constituyen sitios potencialmente fosforilables. A pesar de ello, a día de hoy, solo se han identificado dos residuos fosforilados *in vivo*; la Ser919 fosforilada por PKD en respuesta a é.f <sup>(107)</sup>, y la Tyr1096 que se fosforila en respuesta al factor de crecimiento neuronal (NGF) <sup>(8)</sup>. Sin embargo, marcajes de las células PC12





con  $\gamma^{32}\text{P}$  *in vivo* demostraron que Kidins220 se encuentra fosforilado incluso en condiciones basales (107).

Clonada inicialmente en células de feocromocitoma de rata (PC12), Kidins220 es una proteína altamente conservada en la escala evolutiva –existen ortólogos en nematodos, insectos y mamíferos– que presenta una única copia en todos los genomas incluyendo el humano, sugiriendo una función evolutivamente conservada y no redundante, desconocida hasta la fecha. Los trabajos realizados hasta día de hoy la señalan como una proteína adaptadora cuya función podría ser la de andamiaje o *scaffolding* para el reclutamiento de complejos de señalización. Un estudio realizado a partir de comparación de secuencias y de predicciones basadas en la homología estructural incluye a Kidins220 en una nueva familia de NTPasas con lazo-P denominada KAP (7). A su vez numerosas NTPasas con lazo-P de otras familias han sido implicadas en el transporte a membrana y la secreción (102).

## **I6.2- Distribución/Localización y vías de señalización en las que participa Kidins220**

En neuronas y células PC12 diferenciadas con NGF, Kidins220 presenta una distribución polarizada encontrándose en las puntas de las neuritas así como en un compartimiento vesicular interno todavía no identificado (28, 107). En estas células la actividad de PKD1 y 2 regula el transporte a la membrana plasmática de Kidins220, un proceso en el que el motivo de unión a proteínas PDZ de PKD juega un papel clave (233). A su vez  $\alpha$ -sintrofina interacciona a través de su dominio PDZ con Kidins220 y regula la localización de esta última en las uniones neuromusculares (154).

Meses más tarde de su descubrimiento como sustrato de PKD, el grupo del Dr. Moses V. Chao identificó a Kidins220/ ARMS en las mismas células, como un efector específico de las vías de señalización de los receptores de neurotrofinas y efrinas que se fosforila en

múltiples tirosinas en respuesta a NGF, BDNF y Efrina B2 (132). Dicho trabajo y posteriores publicaciones del mismo grupo también postularon que dado el grado de solapamiento entre las cinéticas de fosforilación de Kidins220 y las de activación de los receptores de neurotrofinas y efrinas, Kidins220 era un buen candidato como sustrato de dichos receptores (9, 132).

Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento que ejercen sus funciones a través de los receptores con actividad tirosín-quinasa Trk y del receptor neurotrófico p75<sup>NTR</sup>. La señalización mediada por neurotrofinas es responsable de una gran variedad de efectos en el sistema nervioso incluyendo supervivencia celular durante desarrollo embrionario, diferenciación, crecimiento axonal y ramificación de dendritas, así como modulación de la actividad sináptica (34).

Al igual que para otros factores de crecimiento, los receptores de neurotrofinas son activados por su ligando que provoca su dimerización y trans-fosforilación en tirosinas promoviendo el posterior reclutamiento de distintas proteínas adaptadoras y efectoras que provocan la activación de diversas rutas de señalización. Aunque muchas de estas vías de señalización son comúnmente activadas en distintos contextos y por distintos factores de crecimiento y citoquinas, la activación prolongada de las MAPK ha sido descrita como una característica típica de la señalización por neurotrofinas que conduce a la diferenciación neuronal (161). Así, los distintos trabajos del grupo del Dr. Chao han puesto de manifiesto la participación de Kidins220 en esta vía de señalización como una plataforma de reclutamiento y anclaje que forma complejos constitutivos Kidins220-Trk-CrkL que se inducen en respuesta a neurotrofinas (9). La rápida fosforilación de la Tyr1096, presente en la región rica en prolinas de Kidins220, juega un papel crítico en las cascadas de señalización a largo plazo inducidas por neurotrofinas. Así, dicha fosforilación recluta a CrkL por su dominio SH2 dejando libre el

dominio SH3 de dicho adaptador (por el que previamente interactuaban CrkL y Kidins220) permitiendo la unión de C3G y la posterior activación sostenida de la cascada de las MAPK mediada por Rap1<sup>(8,9)</sup>.

Este mismo grupo también estableció que la asociación de Kidins220 y Trk tiene lugar a través de sus respectivos dominios transmembrana. La sobre-expresión de la región transmembrana de Kidins220 responsable de dicha interacción provoca una inhibición de las vías de MAPK así como una drástica disminución de la neuritogénesis en respuesta a NGF en células PC12<sup>(9)</sup>. Idénticos efectos bloqueantes de la diferenciación de las células PC12 producía a su vez la sobre-expresión de una versión mutante de Kidins220 carente de la región rica en prolinas.

Otro estudio se ha adentrado en el papel desarrollado por Kidins220 en la señalización mediada por los receptores de efrinas demostrando que la supresión de la expresión de Kidins220 mediante ARNi reduce la fosforilación en tirosinas del receptor EphA4 mediada por la efrina A1<sup>(154)</sup>.

### **I6.3- Kidins220 se expresa en células del sistema inmune**

Inicialmente descrita como una proteína neuroespecífica, la presencia de Kidins220 apenas era detectable en otros tejidos<sup>(107)</sup>. Dicha observación fue matizada posteriormente por ensayos de hibridación *in situ* en embriones de rata que detectaron la expresión del ARN mensajero (ARNm) de Kidins220 en diversos tejidos no neuronales, si bien su expresión era mucho más abundante en el sistema nervioso<sup>(132)</sup>. Estos mismos estudios, demostraron que durante el desarrollo embrionario la expresión de Kidins220 se restringe básicamente a las áreas del sistema nervioso central y periférico cuyas neuronas post-mitóticas se encuentran en estadios de diferenciación y migración. Recientemente, se ha demostrado la presencia de Kidins220 en la región postsináptica de las uniones neuromusculares durante el desarrollo del músculo, si

bien sus niveles de expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína descienden gradualmente siendo prácticamente imperceptibles en individuos adultos<sup>(154)</sup>.

Significativamente, un trabajo realizado hace dos años por nuestro laboratorio en colaboración con otros investigadores, descubrió por primera vez la expresión de Kidins220 en un contexto totalmente diferente, certificando su presencia en células dendríticas humanas inmaduras<sup>(221)</sup>. En dicho estudio, caracterizamos los distintos estadios morfológicos que atraviesa una célula dendrítica inmadura en movimiento determinando que durante su desplazamiento sobre distintos sustratos las células dendríticas inmaduras pasan constantemente de un estadio monopolar MP (donde se diferencia claramente el frente de avance de la parte trasera de la célula) a un estadio bipolar BP (con una simetría estructural). Así mientras en células dendríticas en estadios MP Kidins220 se concentra en el frente de avance de las células, en estadios BP Kidins220 está presente en ambos polos. De forma interesante CD43, CD44, ICAM-3 y DC-SIGN también presentan este mismo patrón de distribución.





## **OBJETIVOS**



El objetivo general de esta tesis consiste en analizar el papel desempeñado en los linfocitos T polarizados por PKD y su recientemente descubierto primer sustrato fisiológico Kidins220. Para abordar esta cuestión se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1- Estudiar la expresión y localización subcelular de Kidins220 e identificar proteínas que co-localizan e interaccionan con ella en linfocitos T polarizados.
- 2- Analizar el efecto que ejercen diversos componentes estructurales como el CK de actina o los *lipid rafts* así como la activación de rutas de señalización de PKC sobre la distribución de Kidins220.
- 3- Esclarecer la posible función de Kidins220 y su participación en procesos como polaridad, adhesión y migración de linfocitos T polarizados.
- 4- Identificar proteínas que interaccionan con PKD en linfocitos T polarizados así como posibles sustratos de esta quinasa.
- 5- Analizar qué papel desempeña PKD en la adhesión célula-MEC y célula-célula en linfocitos T polarizados.
- 6- Analizar qué papel desempeña PKD en la motilidad celular y la migración inducida por quimioquinas en dichas células.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## M1- Reactivos y materiales

El forbol-12,13-dibutirato (PDBu), la citocalasina D (Cit.D), la metil- $\beta$ -ciclodextrina (MCDX) y el histopaque-1077, usado para ficolizar las células, así como los Ac monoclonales para  $\beta$ -Actina y  $\alpha$ -Tubulina se compraron a *Sigma-Aldrich*. El GF-I (GF109203X o bis-indoilmaleimida) se obtuvo de *Calbiochem*. Los Ac policlonales frente a Ezrina/Radixina/Moesina (ERM) y fosfo-Ezrina(Thr567)/Radixina(Thr564)/Moesina(Thr558) (P-ERM) se adquirieron de *Cell Signaling Technology Inc.* Los Ac policlonales frente a Caveolina-1 y PKD1/2 fueron suministrados por *Santa Cruz Biotechnology Inc.* Los Ac monoclonales anti-ICAM-3 TP1/24 y HP2/19, anti-CD43, anti-CD44, anti-CD45 fueron donados por el Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital Universitario La Princesa, Madrid). El Ac policlonal que reconoce específicamente la fosforilación en la Ser916 de PKD1 (anti-Pser916) fue proporcionado por las Drs. Sharon Matthews y Doreen Cantrell (Universidad de Dundee, UK). Los Ac policlonales anti-PKD1/2 total y anti-Kidins220 (tanto el que reconoce la región C-terminal como el que reconoce los residuos de la región transmembrana) fueron generados en el laboratorio. Para ello se inmunizaron conejos siguiendo protocolos estándar con péptidos correspondientes a los 17 últimos aa de las regiones C-terminal de PKD1 o de Kidins220, así como los contenidos en la región transmembrana de Kidins220, a los que se añadió una cisteína para su conjugación a KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) suministrado por *Pierce*. Los péptidos empleados tanto para las inmunizaciones como para los ensayos de fosforilación fueron suministrados por *Evoquest (Invitrogen)*. Los Ac secundarios acoplados a peroxidasa para el revelado de los Western Blots (WB) así como el ECL (*Enhanced ChemiLuminescence*) utilizado se compraron a *GE Healthcare Limited*. Los filtros de nitrocelulosa eran de *Schleicher and Schuell BioScience*.

Los Ac secundarios conjugados a Texas-Red, Alexa-488, Alexa-546 y Alexa-647, así como la Toxina Colérica B (CTB) conjugada al fluoróforo Texas-Red fueron obtenidos de *Molecular Probes (Invitrogen)*. El medio de montaje para las inmunofluorescencias (Mowiol 4-88) se compró a *Harco*. Los oligonucleótidos usados como cebadores así como el TRIZOL y la transcriptasa reversa fueron suministrados por *Invitrogen*. La Taq polimerasa fue proporcionada por *Biotoools S.A.* Las cámaras de *transwell* usadas en los ensayos de migración y quimiotaxis se compraron a *Costar*. El SDF-1 $\alpha$  y la IL-2 fueron obtenidos de *PeprroTech EC*. La fitohemaglutinina-L (PHA-L) fue proporcionada por *Roche*.

## M2- Plásmidos y construcciones

### M2.1- Vectores de expresión de PKD1 y sus mutantes en células eucariotas

Para el estudio de la localización de PKD1 y sus mutantes expresados ectópicamente, así como el análisis de su función en los procesos de adhesión, agregación celular, migración y quimiotaxis, usamos las siguientes construcciones: pEFBosGFP, plásmido de expresión eucariota conteniendo la proteína verde fluorescente (GFP) fue utilizado como control; pEFBosGFP-PKD1wt, pEFBosGFP-PKD1ca y pEFBosGFP-PKD1km, que expresan la versión silvestre del enzima (wt), un mutante constitutivamente activo (ca) y otro que carece de actividad quinasa o “*kinasa muerto*” (km). El mutante PKD1ca generado por sustitución de las Ser744 y Ser748 por glutámicos (S744/748E), así como el mutante PKD1km, en el que el Asp733 ha sido remplazado por una alanina (D733A), fueron inicialmente clonados en pcDNA3<sup>(110)</sup>, y posteriormente subclonados en el sitio Eco RI del vector pEFBosGFP, para generar proteínas de fusión que presentan la proteína GFP en su extremo N-terminal<sup>(166, 169)</sup>.

## M2.2- Vectores de expresión de proteínas recombinantes bacterianas del dominio citoplásmico de ICAM-3 y sus mutantes

Para la obtención de una proteína recombinante pura que expresara el dominio citoplásmico de ICAM-3 fusionado al extremo C-terminal de la Glutathione-S-transferasa (GST-ICAM-3wt), utilizamos la construcción pEGFP-ICAM-3WT, cedida por el Dr. Francisco Sánchez Madrid, que contiene la secuencia completa de la molécula de adhesión. A partir de dicho plásmido, amplificamos la secuencia correspondiente al dominio citoplásmico de ICAM-3 (fragmento que comprende toda la cola N-terminal de la proteína desde la Arg482 al Glu518) mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, y para facilitar su posterior clonaje, se emplearon oligonucleótidos cebadores de la parte 5' que incorporan el sitio de restricción para BamHI (en negrita 5'-GAG **GAT CCA** GGG AGC ACC AAC GGA GC-3'), y de la parte 3' de la secuencia final de ICAM-3 con el sitio de restricción para XhoI (en negrita 5'-CAT **CTC TCG** AGT CAC TCA GCT CTG GAC GG-3'). El fragmento de 134 pares de bases (pb) obtenido de la PCR fue digerido con BamHI y XhoI, clonado en el plásmido pGEX-4T-1 y secuenciado. La construcción obtenida, denominada pGEX-4T-ICAM-3wt, permite la expresión en bacterias de la proteína GST fusionada al dominio citoplásmico de ICAM-3.

Las construcciones pGEX-4T-ICAM-3-S487A, pGEX-4T-ICAM-3-S489A, pGEX-4T-ICAM-3-S496A, pGEX-4T-ICAM-3-T497A y pGEX-4T-ICAM-3-S503A, que expresan el fragmento citosólico C-terminal de ICAM-3, que va desde la Arg-482 al Glu-518, y que presentan las distintas mutaciones puntuales, fueron proporcionadas por el Dr. Francisco Sánchez-Madrid.

## M2.3- Vectores de expresión de proteínas recombinantes bacterianas del dominio catalítico de PKD1 y sus mutantes

Utilizando como molde los plásmidos pBS-PKD1wt y pBS-PKD1km, que contienen la secuencia completa de la versión silvestre y “kinasa muerto” de PKD1, se clonaron los dominios catalíticos del enzima activo e inactivo, respectivamente, en vectores de expresión procariotas para la obtención de proteínas recombinantes puras fusionadas a GST (GST-PKD1cat-WT y GST-PKD1cat-km).

Para ello, empleamos la tecnología de clonaje GATEWAY (*Invitrogen*) siguiendo las indicaciones del proveedor. En primer lugar, amplificamos por PCR las secuencias correspondientes al fragmento C-terminal de PKD1 (Ser558 a Leu918), y que comprende el dominio catalítico (residuo 593 al 845), con los oligonucleótidos cebadores de la secuencia 5' (5'-AAA AAG CAG GCT CCG GAT CCA ACT CAC ACA AAG ATA-3') y 3' (5'-AGA AAG CTG GGT TTT TGA CAG ATT AGA GGG GAT GGA-3') de PKD1. La región amplificada carece del dominio regulador autoinhibitorio de PKD1 y da lugar a una proteína constitutivamente activa en el caso de la versión silvestre.

Dichos fragmentos de PCR fueron clonados en el vector pDONR201 mediante una reacción de recombinación con la Clonasa BP, generando las construcciones pENTR-PKD1cat-WT y pENTR-PKD1cat-km, cuya secuencia fue confirmada por secuenciación. Finalmente, los dominios catalíticos fueron subclonados en el vector pDEST15 para expresión de proteínas recombinantes en bacterias, que contiene la secuencia GST, mediante otra reacción de recombinación entre vectores GATEWAY con la Clonasa LR. Los vectores obtenidos denominados pDEST15-PKD1cat-WT y pDEST15-PKD1cat-km fueron utilizados para producir proteínas de fusión GST-PKD1cat-WT y GST-PKD1cat-km.

## M2.4- Vectores para la expresión ectópica de Kidins220

La secuencia codificante de Kidins220 fue clonada en los vectores de expresión eucariota pEGFP-N2 y



pEGFP-C2 con objeto de sobre-expresar Kidins220-GFP o GFP-Kidins220, respectivamente, para realizar estudios funcionales. Sin embargo, la expresión ectópica de la proteína completa presentando la GFP fusionada tanto a su extremo N como C-terminal da lugar a una localización aberrante de la misma <sup>(233)</sup>. A partir del plásmido pEGFP-C2-Kidins220, y mediante amplificación por PCR de la región codificada por el último exón de Kidins220 (fragmento de la proteína que va desde la Leu1341 hasta la Leu1763) se generó el plásmido pEGFP-C2-Kidins1340. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos cebadores de la secuencia 5' con el sitio de restricción para EcoRI ( en negrita 5'-GGA **ATT** CAT GCT GAG TTG GCA GTC ACA AAC-3'), y de la secuencia 3' con el sitio de restricción para SalI (en negrita 5'- CCG **TCG ACT** CAG AG A ATG CTC TCT CTC TC-3'). El fragmento de PCR fue digerido con EcoRI y SalI y clonado en el plásmido pEGFP-C2. La transfección de dicha construcción da lugar a una proteína soluble que contiene el extremo más C-terminal de Kidins220 y que presenta la proteína GFP fusionada en el N-terminal.

### **M3- Purificación de proteínas de fusión a GST**

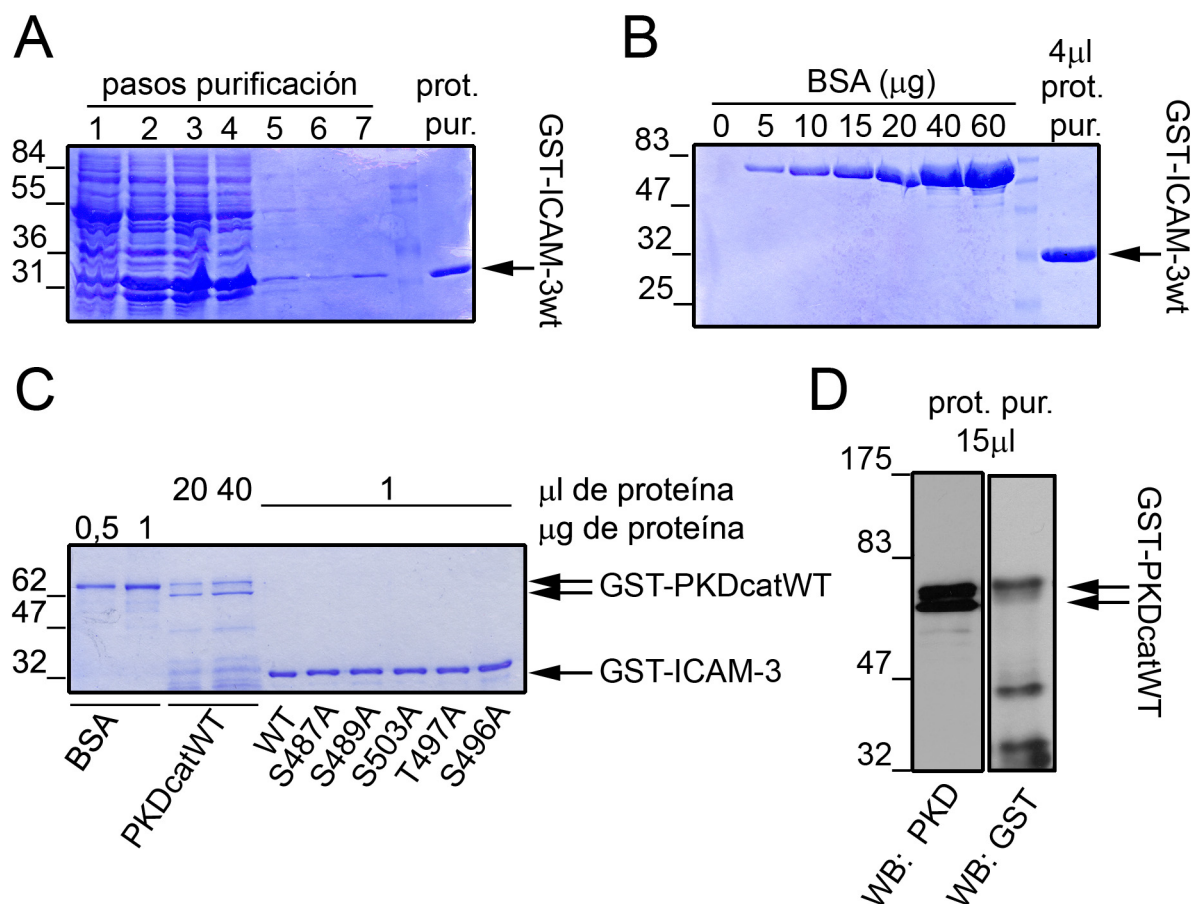
Para producir las proteínas de fusión recombinantes usadas en los ensayos de actividad quinasas *in vitro* (ensayos IVK) seguimos el siguiente procedimiento:

#### **M3.1- Purificación de GST-ICAM-3wt citoplásmico así como de los distintos mutantes puntuales GST-ICAM-3-S487A, GST-ICAM-3S489A, GST-ICAM-3S496A, GST-ICAM-3T497A y GST-ICAM-3S503A.**

Se crecieron inóculos de bacterias E.coli transformadas con los respectivos plásmidos de expresión de las distintas construcciones en 50 ml de medio LB con ampicilina (LBA) durante una noche. Al día siguiente, se tomaron 10 ml de los precultivos para crecerlos durante varias horas en 400 ml de LBA hasta alcanzar una densidad óptima, con valores de densidad óptica

(D.O) del cultivo bacteriano a 600λ de 0,6 a 0,8 (paso 1; ver Fig. M1A). Alcanzado este momento, indujimos los cultivos con 0,4mM de IPTG (Isopropil-thio-β-D-galactopiranosido) durante 3h (paso 2), y los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 5.500rpm durante 15min a 4°C en un rotor *Beckman* JA-10. Los sedimentos de bacterias fueron resuspendidos en tampón de lisis (1% Tritón X-100, 2mM EDTA en PBS) con el cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas a 4°C. Siempre conservando el frío, los lisados de bacterias fueron sonicados 4 veces durante 40s con intervalos de 60s (paso 3) y centrifugados a 10.000rpm durante 15min a 4°C en un rotor *Beckman* JA-14. Los sobrenadantes obtenidos (paso 4) se transfirieron a tubos de 50 ml con 1ml de una resina de glutatión-sefarosa al 50% en PBS, y se incubaron durante 4h a 4°C con rotación. Tras la incubación, se realizaron varios lavados en frío, el primero con tampón de lisis (paso 5), seguido de tres lavados con 2mM EDTA en PBS (pasos 6, 7 y 8). Tras resuspender la matriz de glutatión-sefarosa en 3ml de PBS frío, las muestras fueron pasadas a columnas (*Biorad*) y posteriormente eluidas con 7,5ml de una solución de glutatión 25mM preparada en 50mM Tris-HCl a pH8. Los eluidos fueron recogidos en 7 fracciones de 1ml. La concentración proteica fue determinada midiendo la D.O. a 280 nm de todas las fracciones. Las proteínas de fusión purificadas se encontraron principalmente en las 3-4 primeras fracciones (paso 9). Por último, las cuatro primeras fracciones de cada elución se juntaron y fueron dializadas en una solución de 20mM HEPES pH7,4, 30mM NaCl, 5% Glicerol y 0,1mM DTT durante una noche. Las proteínas purificadas obtenidas fueron alícuotadas y congeladas para su uso posterior. En todos los casos se tomaron alícuotas de 100μl de cada paso realizado, para analizar el proceso de purificación de cada una de las proteínas de fusión (Fig. M1A,B).

#### **M3.2-Purificación de los dominios catalíticos de PKD1, GST-PKD1cat-WT y GST-PKD1cat-km**



**Figura M1: Purificación de proteínas de fusión a GST**

**A-** Las muestras correspondientes a los diferentes pasos de purificación (1 al 7; ver métodos) de la proteína de fusión GST-ICAM-3wt citoplásmico fueron separadas en un gel de poliácridamida al 15% que fue posteriormente teñido con azul de coomasie. La flecha señala la proteína de fusión con un tamaño esperado de 32KDa. **B-** La proteína de fusión GST-ICAM-3wt citoplásmico purificada fue cuantificada midiendo la Abs a 280nm en un espectrofotómetro. Se realizó también una curva patrón de BSA y las muestras fueron separadas en un gel de poliácridamida al 15% que fue teñido con azul de coomasie para estimar tanto la concentración como la integridad dela proteína. **C-** La versión silvestre así como los distintos mutantes de la proteína de fusión GST-ICAM-3 citoplásmico resuspendidos a 1mg/ml, así como la proteína de fusión GST-PKDcatWT son mostrados en este gel de poliácridamida al 12%. Nótese que a diferencia de las distintas construcciones GST-ICAM-3, la purificación de las proteínas de fusión GST-PKDcat dieron un rendimiento mucho menor. Las flechas señalan la banda correspondiente a las distintas variantes de GST-ICAM-3 citoplásmico purificadas así como el doblete correspondiente a GST-PKDcat. **D-** 15µl de la proteína purificada recombinante GST-PKDcatWT fue analizada por WB con los Ac anti-PKD y anti-GST. Nótese el doblete de PKD y los fragmentos de esta proteína de fusión.

Los plásmidos pDEST15-PKD1cat-WT y pDEST15-PKD1cat-km resultaron ser menos eficaces en la producción de las proteínas de fusión que el plásmido pGEX-4T, dando rendimientos muy bajos. Debido a las dificultades que tuvimos a la hora de purificar las proteínas de fusión GST-PKD1cat-WT y GST-PKD1cat-km producidas por estos vectores el protocolo de purificación fue ligeramente modificado.

Los cambios introducidos fueron los siguientes:

- 1- Para la transformación utilizamos la cepa E.coli BL21-CodonPlus (DE3)Cril<sup>+</sup>, una cepa mejorada de E.coli distinta a la utilizada de forma rutinaria en el laboratorio, que fue crecida en medio LBA con 50 mg/ml de cloranfenicol.
- 2- En el paso 2 la inducción del cultivo se hizo con concentraciones más altas de IPTG (1mM de IPTG) y durante 4h.

3- En el paso 9, la elución de las columnas se realizó con 3,5 ml de la solución de glutatión, se recogieron 4 fracciones y se dializaron solo las dos primeras.

Estas modificaciones condujeron a una optimización de las condiciones de purificación de las proteínas de fusión GST-PKD1cat-WT y GST-PKD1cat-km expresadas por el vector pDEST15. Aún así las cantidades de proteína purificada fueron netamente menores que en el caso anterior (ver Fig. M1C y D).

Las proteínas de fusión obtenidas GST-PKD1cat-WT y GST-PKD1cat-km son de tamaño sensiblemente mayor que la GST-PKD1cat que nos fue generosamente proporcionada por el Dr. Peter Parker, y que utilizamos en varios de los ensayos IVK.

#### **M4- Cultivos celulares y tratamientos**

La línea de células T humanas Peer  $\gamma\delta$  CD3+, la línea linfoblastoide HSB2 y la línea celular derivada de Jurkat JHM1-2.2 fueron mantenidas en cultivo en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y glutamina 2mM. La línea celular PC12, derivada de feocromocitoma de rata, fue mantenida en cultivo en medio DMEM suplementado con 7,5% de FBS, 7,5% de suero de caballo y glutamina 2mM. Los linfoblastos T humanos fueron preparados mediante protocolos estandarizados descritos previamente <sup>(223, 224)</sup>. A partir de *buffy coats* de sangre de donantes sanos se procedió a separar los leucocitos del resto de componentes sanguíneos por su diferente capacidad de sedimentación en gradientes de ficol. Tras este primer paso de purificación, seleccionamos los linfoblastos T humanos del cultivo de leucocitos de sangre periférica tratando con PHA-L al 0,5% durante 48h, para posteriormente lavarlos y crecerlos en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS, glutamina 2mM y 50 U/ml de IL-2.

Cuando fue requerido las células se trataron con MCDX (7,5mM) durante 1h, Cit.D (5 $\mu$ g/ml) durante 30min, GF-I (3,5 $\mu$ M) durante 1h, PDBu (200nM) durante 15min, con el Ac monoclonal anti-ICAM-3

HP2/19 diluido 1/20, el Ac policlonal anti-Kidins220 transmembrana (anti-Tmb) diluido 1/20 o con la quimioquina SDF-1 $\alpha$  (10ng/ml) durante los distintos tiempos especificados en cada experimento.

#### **M5- Análisis de expresión de Kidins220 y Caveolina-1 por RT-PCR**

Se aisló ARN total de las distintas líneas celulares usando TRIZOL, se trató posteriormente con DNAsa, y fue retro-transcrito a ADN copia (ADNc). Las secuencias específicas de Kidins220 fueron amplificadas mediante una PCR de 35 ciclos usando el siguiente par de oligonucleótidos como cebadores específicos en 5'(5'-GGT GCC CCT CGT CAC AGT AAT CTA AGT TGG CAG-3') y 3'(5'-GAG TAG AAT GGA TGG AGC CCC CTG AAG AGC-3'), que comprenden los nucleótidos 4000 a 4033 y 4853 a 4819 de la secuencia del ARNm de Kidins220, respectivamente. Tras la amplificación, se obtuvo un fragmento específico de 853 pb.

Para detectar la expresión de caveolina-1 realizamos una PCR de 35 ciclos usando como cebadores específicos de esta isoforma de caveolina el oligonucleótido 5' que corresponde a las posiciones 1 a 23 de la secuencia codificante de caveolina-1 (5'-ATG TCT GGG GGC AAA TAC GTA G- 3') y el oligonucleótido 3' que comprende las posiciones 137 a 118 de esta misma secuencia (5'-GTG TGC GCG TCG TAC ACT TG- 3'). La reacción de amplificación dio lugar a un fragmento de 137 pb. La identidad de los fragmentos obtenidos de las PCR de Kidins220 y caveolina-1 fue comprobada por secuenciación usando un secuenciador automático de *Applied Biosystems*.

#### **M6- Inmunoprecipitaciones y análisis por Western Blot (WB)**

Las células fueron recogidas por centrifugación y lisadas durante 30min a 4°C en 600 $\mu$ l de Tampón RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 1% Tritón X-100, 1% Deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT) con el cóctel de inhibidores de

proteasas y fosfatasa. Posteriormente, los lisados celulares fueron centrifugados en una microfuga a 14.000rpm a 4°C durante 15min para separar la fracción insoluble del resto del lisado celular (Sobrenadante). Una décima parte de cada sobrenadante (60µl) fue diluida en 20 µl de tampón de carga Laemmli 4x (400mM Tris-HCl pH 6.8, 0.2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2mM EDTA, 12% SDS, 8% 2-mercaptoetanol, 10% Glicerol), constituyendo los lisados totales (LT).

Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo en una noria durante 12h a 4°C mediante la incubación de los sobrenadantes celulares (provenientes de 30x10<sup>6</sup> células) con los correspondientes Ac previamente acoplados durante 2h a proteína A- o proteína G-sefarosa. Transcurrido este tiempo, los inmunoprecipitados se centrifugaron a 12.000rpm durante 1min, y se lavaron 6 veces en tampón RIPA, antes de ser resuspendidos en 60µl de tampón de carga Laemmli 2x.

Para las inmunoprecipitaciones de ICAM-3 usamos el Ac monoclonal TP1/24 purificado y acoplado a proteína G-sefarosa. En el caso de los Ac policlonales para Kidins220, PKD1 total, caveolina-1 y proteínas ERM utilizamos proteína A-sefarosa.

Para el análisis por WB, los lisados totales, los inmunoprecipitados o las distintas fracciones celulares, se hirvieron durante 5min en tampón de carga, y fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (geles SDS-PAGE), a distinta concentración en función del tamaño de la proteína a detectar. Las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con tampón de transferencia (200mM Glicina, 25mM Tris-HCl, 10% CH<sub>3</sub>OH) a 350 mA durante 70min a 4°C. Tras bloquear las membranas con 5% de leche desnatada en TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20) durante 2h, se incubaron con los correspondientes Ac primarios diluidos 1/1000 en 1% de leche desnatada en TBS-T. Una vez finalizado este paso, se realizaron 4 lavados sucesivos con TBS-T y se

procedió a la incubación con el correspondiente Ac secundario acoplado a peroxidasa durante 1h a una dilución 1/5000 en 1% de leche en TBS-T. Finalmente, se volvieron a repetir los lavados y se procedió al revelado de las bandas inmunoreactivas con ECL.

Para la competición específica de la banda de Kidins220, el Ac policlonal que reconoce el extremo C-terminal de la proteína fue preincubado durante 2h con el péptido de inmunización usado para la generación de dicho Ac y posteriormente utilizado en los ensayos de WB<sup>(107, 221)</sup>.

Los WB con el Ac anti-Pser916 para determinar la fosforilación de PKD por estímulos diferentes a los é.f se realizaron diluyendo los Ac primario y secundario en 0,5% de BSA en TBS-T con un bloqueo previo con 3% de BSA en TBS-T durante 2h.

## **M7- Aislamiento de balsas lipídicas o *lipid rafts***

El aislamiento de microdominios especializados de la membrana plasmática, balsas lipídicas o *lipid rafts* se llevó a cabo mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, siguiendo un protocolo estándar utilizado en el laboratorio<sup>(28, 221)</sup>. Las células Peer fueron resuspendidas en medio sin suero y tratadas o no con MCDX (15mM) durante 1h a 37°C. Mediante tinciones con azul de tripano comprobamos que los tratamientos con MCDX no afectaban a la viabilidad celular. Tras el tratamiento, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 1ml de tampón de solubilización (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.25% TritónX-100) con el cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Al cabo de 30min a 4°C, se ajustó la concentración de sacarosa de los lisados celulares a 41% antes de recubrirlos con 8,5ml de sacarosa al 35% y 2,5ml de sacarosa al 16% preparada en 10mM Tris-HCl pH7.4. Para el aislamiento de las balsas lipídicas, ultracentrifugamos los tubos a 35.000rpm durante 18h a 4°C en un rotor SW41, y recogimos 10 fracciones de cada gradiente, numeradas del 1 al 10 desde la parte superior hasta la parte inferior

del tubo. Cada fracción fue precipitada con 6,5% de ácido tricloroacético en presencia de 0,05% de deoxicolato sódico, lavada con acetona fría al 80% y disuelta y hervida en tampón de carga Laemmli 2x. Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a nitrocelulosa para su análisis por WB.

## **M8- Ensayos de actividad quinasa in vitro de PKD**

### **M8.1- Ensayos IVK de PKD en inmunoprecipitados de lisados celulares.**

Tras la inmunoprecipitación durante 2h de PKD o de ICAM-3 procedimos a analizar la actividad de la quinasa presente en los inmunoprecipitados mediante ensayos IVK. Para ello, los inmunoprecipitados fueron lavados 6 veces con distintos tampones. Primero se lavaron 2 veces con tampón L+T (50mM Tris-HCl, pH 7,6 , 2mM EGTA, 2mM EDTA, 1% Tritón X-100), luego 2 veces con tampón L-T (50mM Tris-HCl, pH 7,6, 2mM EGTA, 2mM EDTA), y por último 2 veces con tampón de ensayo quinasa BK (30mM Tris-HCl, pH 7,6 , 10mM MgCl<sub>2</sub> , 2mM DTT).

El ensayo IVK se llevó a cabo a 30°C en BK en presencia de trazas de [ $\gamma^{32}$ P]-ATP y con 100 $\mu$ M de ATP total durante 20min. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción con 70 $\mu$ l de tampón de carga Laemmli 2x.

### **M8.2- Ensayos IVK de PKD1 con fragmentos de proteínas puras recombinantes fusionadas a GST.**

Realizamos este tipo de ensayos para estudiar la fosforilación de las proteínas de fusión GST-ICAM-3 por parte del dominio catalítico purificado de PKD1 (GST-PKD1cat-WT y GST-PKD1cat-km). GST-ICAM3-wt y sus versiones mutantes se unieron a la matriz de glutatión-sefarosa durante 2h. Transcurrido este tiempo los complejos fueron sedimentados por centrifugación suave a 1.200rpm y lavados 2 veces con BK. Este paso previo nos permitió concentrar las proteínas en la resina y eliminar el glicerol en el que se encuentran resuspendidas las proteínas de fusión

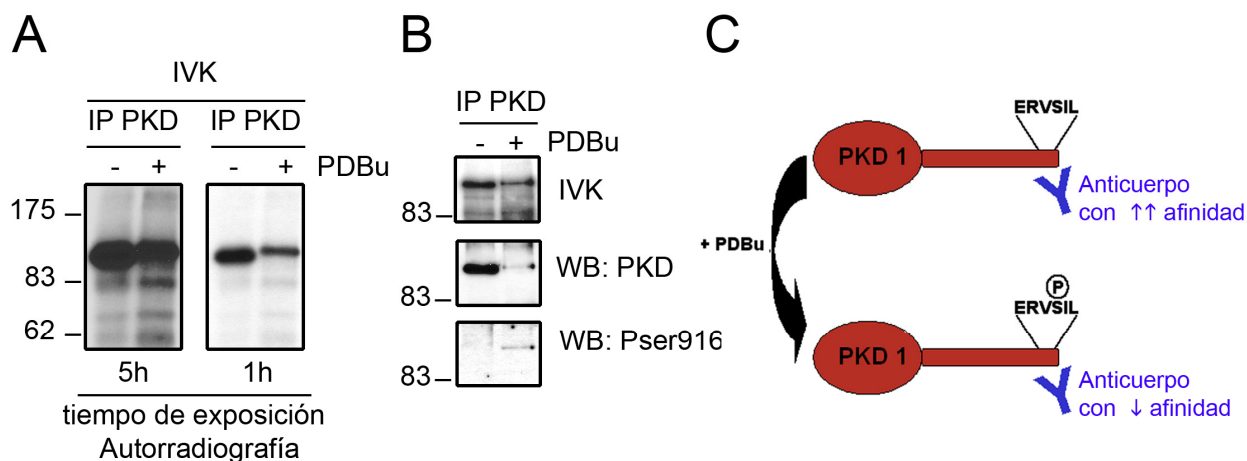
recombinantes, algo necesario puesto que el glicerol afecta negativamente en los ensayos de fosforilación *in vitro*. Llevamos a cabo el ensayo de actividad quinasa en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, en presencia o ausencia de distintas concentraciones de GST-PKD1cat-WT y GST-PKD1cat-km.

En ambos casos las muestras marcadas radiactivamente fueron separadas en geles grandes (de 18cm x 15cm) SDS-PAGE al 8% o al 15%, respectivamente, que fueron secados y expuestos para la detección de las bandas fosforiladas por autorradiografía. En determinados casos, los geles fueron transferidos a nitrocelulosa para, tras autorradiografiarse, comprobar la identidad de alguna de las bandas presentes en la autorradiografía mediante WB.

### **M8.3- Ensayos IVK de PKD1 con péptidos.**

Para analizar la capacidad de fosforilación de distintos péptidos por PKD1, se realizaron el mismo tipo de ensayos IVK con 100ng de GST-PKD1cat-WT en presencia o ausencia de cada péptido resuspendido en BK a una concentración final de 2.5mg/ml. A los 30min paramos la reacción con 100  $\mu$ l de ácido ortofosfórico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (75mM) y 80 $\mu$ l de cada reacción de fosforilación fueron añadidos sobre papel de fosfocelulosa P-81 (*Millipore Corporation*). El [ $\gamma^{32}$ P]-ATP no incorporado fue separado de los péptidos marcados radiactivamente mediante 3 lavados de 5min cada uno con abundante H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y un lavado posterior con acetona. Los filtros P-81 fueron secados y se procedió a la medición en cuentas por minuto (cpm) de la radiactividad incorporada en cada muestra en un contador beta de centelleo LKB Wallac 1209RACKBETA de *PerkinElmer*. Para cada experimento realizamos un triplicado de cada condición.





**Figura M2. El Ac para PKD presenta una menor afinidad por la forma fosforilada/activa de la quinasa**

Los lisados de células Peer sin tratar (-) o tratadas (+) con PDBu fueron inmunoprecipitados con anti-PKD durante dos horas para realizar posteriormente un ensayo IVK en presencia de [ $\gamma^{32}$ P] ATP. **A-** Las muestras fueron resueltas en geles grandes SDS-PAGE que fueron secados y auto-radiografiados para detectar las bandas radiactivas. Como podemos observar tanto en la exposición larga (5h) como en la más corta (1h), los tratamientos con PDBu provocan un cambio de la movilidad electroforética de la banda que corresponde a PKD. A su vez esta banda tiene una intensidad menor en los inmunoprecipitados de células tratadas con PDBu. **B-** Las mismas muestras fueron resueltas en mini-geles SDS-PAGE y transferidas a filtros de nitrocelulosa. Dichas membranas fueron expuestas para obtener autorradiografías (panel superior, IVK), realizándose posteriormente WB con anti-PKD y anti-Pser916 para detectar PKD “total” y fosforilada en la Ser916 (PKD-Pser916). La autorradiografía (panel superior) y los correspondientes WB con anti-PKD (panel central) y anti-Pser916 (panel inferior) demuestran claramente la menor afinidad del Ac para PKD total por la forma fosforilada/activa en la serina más próxima al C-terminal. **C-** Esquema ilustrativo de la auto-fosforilación provocada en la Ser916, próxima al C-terminal, por la activación con PDBu del enzima. Esta región C-terminal fue la utilizada como epítipo para generar el Ac.

## M9- El problema del Ac anti-PKD

Al poner a punto los ensayos IVK a partir de inmunoprecipitados de PKD de células Peer para determinar su grado de actividad por autofosforilación, pudimos comprobar en las autorradiografías realizadas que al tratar las células con PDBu la banda radiactiva correspondiente a PKD sufría un retardo en su movilidad electroforética con respecto a la observada en condiciones básicas. Sin embargo, de forma llamativa, esta banda de autofosforilación presentaba una intensidad significativamente menor (Fig. M2A). Esta disminución de la señal radiactiva al tratar con PDBu solo podría explicarse por una menor afinidad del Ac por la forma fosforilada de la proteína ya que es sobradamente conocido que los é.f aumentan muy significativamente la actividad de PKD. El hecho de que el Ac reconozca peor la forma fosforilada de PKD

conllevaría a una menor inmunoprecipitación de la quinasa en condiciones que favoreciesen su estado fosforilado (como es el caso de los tratamientos con é.f).

Con la intención de comprobar este hecho realizamos nuevamente ensayos IVK de muestras similares y separamos las muestras en mini-geles SDS-PAGE que transferimos a filtros de nitrocelulosa. Las membranas fueron primero expuestas para detectar por autorradiografía las bandas radiactivas, y posteriormente se inmunodetectaron las bandas correspondientes a PKD “total” y a PKD-Pser916 por WB, con anti-PKD y anti-Pser916, respectivamente (Fig. M2B). En el WB con anti-PKD puede observarse una clara disminución de la señal de PKD total en el carril correspondiente a los inmunoprecipitados de células estimuladas con PDBu (Fig. M2B panel central).

A su vez, el WB con anti-Pser916 detecta una banda en estos últimos inmunoprecipitados indicando que, tras el tratamiento con PDBu, la proteína está efectivamente fosforilada en la Ser916 (Fig. M2B panel inferior). En conjunto, estos resultados demuestran que el Ac de PKD detecta con dificultad la forma del enzima fosforilada en la Ser916. Este efecto puede a veces pasar desapercibido en lisados totales (según el lote o *batch* de Ac utilizado), sin embargo se magnifica en las inmunoprecipitaciones pues se suma el efecto de inmunoprecipitar menos cantidad de PKD con un peor reconocimiento de la quinasa en el WB posterior (Fig. M2B panel central).

La menor afinidad del Ac para PKD por la forma fosforilada en la Ser916 de la proteína concordaría con el hecho de que este Ac fue generado utilizando los 17 últimos aa del extremo C-terminal de PKD1 que contienen la Ser916 (véase el esquema explicativo Fig. M2C). Probablemente, la fosforilación de dicho residuo provoque impedimentos estéricos que dificulten la unión del Ac a dicha secuencia.

El hecho de que el Ac para PKD reconozca peor la proteína tras estimular las células con PDBu, nos ha dificultado enormemente (y en ciertas ocasiones imposibilitado) la identificación y caracterización de interacciones de diversas moléculas con la proteína activa o inactiva, impidiéndonos profundizar en el estudio de los cambios de interacción de otras proteínas con PKD endógena ligados a cambios en el estado de activación/fosforilación de esta última.

## M10- Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las líneas celulares Peer, HSB2 o JHM1-2.2 fueron resuspendidas en medio completo a  $1 \times 10^6$  células por ml (céls/ml) y sembradas sobre cubres de cristal recubiertos con fibronectina (Fn) (25 µg/ml). Las células se dejaron sedimentar sobre el cubreobjetos durante 1h a 37°C, se sometieron a distintos tratamientos, y se fijaron y permeabilizaron con metanol durante 4min a -20°C. Tras varios lavados con

PBS, se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas con una solución de 1% BSA en PBS durante 15min. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 1h a temperatura ambiente con el correspondiente Ac primario diluido en PBS con 3% de suero de oveja. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con los diversos Ac secundarios conjugados a distintos fluoróforos. Una vez lavado este último paso con PBS, los cubres se montaron en portaobjetos con el medio de montaje Mowiol 4-88.

En algunos casos, se procedió al marcaje de microdominios especializados de la membrana plasmática o balsas lipídicas (*lipid rafts*) mediante ensayos de unión *in vivo* de la CTB conjugada al fluoróforo *Texas Red*. Dicha toxina se une con alta afinidad al gangliósido GM1, enriquecido en este tipo de dominios de membrana. En estos casos las células fueron incubadas durante 30min a 4°C con la CTB (50 µg/ml) previamente a la fijación y permeabilización con metanol.

Las imágenes de microscopía confocal fueron adquiridas en unos casos en un microscopio de barrido láser confocal *LSM510 META* acoplado a un microscopio invertido *Axiovert 200* (Zeiss) y en otros utilizando un Confocal *Radiance 2000* (BioRad) acoplado a microscopio invertido *Axiovert S100 TV* (Zeiss). Todas las imágenes se tomaron con el objetivo de inmersión 63X/1.40 Plano Apocromático y corresponden a secciones individuales o proyecciones máximas en el eje z de una serie de secciones tomadas cada 0,4 µm, según se especifique en el texto o en el pie de figura. Las imágenes fueron procesadas con los programas de Zeiss *LSM5 Image Browser* (para el confocal *LSM510 META*) o con el programa *Confocal Assistant 4.02* (para el confocal *Radiance 2000*) y con el programa *Adobe Photoshop 7.0* de Adobe Systems Inc.

## M11- Transfecciones transitorias

Las transfecciones transitorias en la línea celular Peer se realizaron por electroporación, usando un

electroporador *Gene Pulser* de *Biorad* y cubetas de 4mm de ancho de *BTX*. Para cada transfección se tomaron  $20 \times 10^6$  de células crecidas en medio completo a una concentración de  $6 \times 10^5$  céls/ml, se lavaron dos veces en PBS frío y se resuspendieron en 500µl de Optimem (*Invitrogen*) a 4°C a lo que se añadieron 5 µg del ADN plasmídico correspondiente en cada caso. La electroporación de las células se llevó a cabo dando un pulso a 280V y 975µF, tras el cual se resuspendieron las células en 10ml de medio completo.

Las transfecciones transitorias en la línea celular JHM1-2.2 también se realizaron por electroporación. En este caso, se tomaron  $20 \times 10^6$  células crecidas en medio completo a una concentración de  $6 \times 10^5$  céls/ml y tras centrifugarlas se resuspendieron en 600µl de medio completo al que se añadieron 5 µg del ADN plasmídico correspondiente en cada caso. La electroporación de las células se llevo a cabo dando un pulso a 290V y 975µF, tras el cual se resuspendieron las células en 10ml de medio completo. En ambos casos, 24h post-transfección se procedió a realizar una ficolización de las células para eliminar aquellas que habían muerto durante la electroporación. La ficolización consiste en la separación de las células vivas de las muertas por su diferente capacidad de sedimentación en el ficol así tras centrifugar a 400xg durante 30min las primeras quedan retenidas en la interfase entre el ficol y el medio completo mientras que las segundas sedimentan en el fondo del tubo. Tras este paso se procedió a la comprobación de las eficiencias de transfección detectando el porcentaje de células transfectadas (GFP positivas) mediante citometría de flujo.

## M12- Ensayos de migración y quimiotaxis

Para los ensayos de migración, las células Peer transfectadas 48h antes, y posteriormente ficolizadas, fueron sembradas en *transwells*: placas de 24 pocillos donde cada pocillo presenta una cámara superior, que incluye filtros de policarbonato con poros de 5µm de diámetro, y una cámara inferior.

Para cada experimento, realizamos triplicados de cada condición sembrando en la cámara superior 100µl de células resuspendidas en RPMI con 0,1% de BSA a una concentración de  $5 \times 10^6$  céls/ml. Añadimos a su vez en el pocillo o cámara inferior 500µl del mismo medio en ausencia o presencia de la quimioquina SDF-1α a concentración 10ng/ml. También añadimos en un pocillo sin cámara superior 100µl de células a idéntica concentración y 500µl del mismo medio, este pocillo es el *input*, es decir el que nos dará el número total de células verdes (transfectadas o GFP positivas) que tenemos de partida para cada construcción.

Tras 2h de incubación a 37°C 5%CO<sub>2</sub> recogimos las células que habían migrado al compartimento inferior así como los *inputs* para cada transfección y analizamos el número de células transfectadas de cada condición por citometría de flujo. La migración basal, es decir en ausencia de estímulo quimiotáctico, se cuantificó determinando el porcentaje de células GFP positivas que habían migrado frente al total de células verdes que teníamos inicialmente (*input*). La quimiotaxis, es decir la capacidad de las células para responder frente a un determinado estímulo quimiotáctico (en este caso la presencia de SDF-1α) se determinó calculando el índice quimiotáctico, cociente de las células GFP positivas que han migrado en presencia de dicha quimioquina frente a las células verdes que migraron en situación basal.

Para los ensayos de migración en presencia del Ac anti-Tmb de Kidins220, las células Peer resuspendidas en RPMI con 0,1% de BSA a una concentración de  $5 \times 10^6$  céls/ml fueron pretratadas o no durante 1h con una dilución 1/20 de dicho Ac. Tras el pretratamiento, llevamos a cabo los ensayos de migración en *transwell* en presencia o ausencia de SDF-1α (10ng/ml) de idéntica forma a lo descrito anteriormente. También mediante citometría de flujo, analizamos el número de células que migraron en cada caso. En esta ocasión, el índice quimiotáctico es el cociente del número total de células que migraron en presencia de SDF-1α frente al número total de las que migraron en situación basal.



Los ensayos de migración en la línea de linfocitos T Peer se hicieron siguiendo las mismas condiciones (concentración de las células, tiempos de migración, así como dosis de SDF-1 $\alpha$ ) previamente establecidas para dicha línea celular <sup>(288)</sup>.

### M13- Ensayos de motilidad

Para los ensayos de motilidad, las células Peer transfectadas 48h antes fueron ficolizadas y posteriormente seleccionadas mediante separaciones celulares de alta velocidad o *cell sorting*, realizadas en un citómetro de flujo *FACS Vantage SE* de la firma *Becton Dickinson* (BD). Los separadores celulares o *cell sorters* permiten un enriquecimiento del cultivo, obteniendo cultivos celulares con un 90-100% de células transfectadas. Tras este paso previo de selección, los cultivos de células transfectadas fueron resuspendidos a 2x10<sup>5</sup> céls/ml en medio completo y se sembraron:

(A) 100 $\mu$ l sobre pocillos de una placa de 96 directamente recubiertos con Fn a concentraciones bajas (0,3 $\mu$ g/ml) o (B) 350 $\mu$ l sobre pocillos con cubre-objetos de cristal recubiertos con Fn (25 $\mu$ g/ml).

En ambos casos, dejamos posarse las células sobre la Fn unos 10min en las cámaras atemperadas a 37°C del *videolapse*. Tras este tiempo se tomaron imágenes cada 15s durante 30min. El análisis posterior de la trayectoria y distancia recorrida por cada célula fue realizada con el programa *analySIS* de *Soft Imagen System GmbH* con la inestimable ayuda del Servicio de Imagen Científica del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

### M14- Ensayos de adhesión a fibronectina

Para los ensayos de adhesión, recubrimos con 50 $\mu$ l de Fn (12,5 $\mu$ g/ml) en PBS cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Tras 24h a 37°C lavamos los pocillos 2 veces con agua destilada y procedimos a bloquear las uniones inespecíficas añadiendo 200 $\mu$ l de BSA 1% en PBS durante 2h a 37°C. Lavamos 3 veces con PBS, dejamos secarse la placa y sembramos 6x10<sup>4</sup> células Peer transfectadas 48h antes en 50 $\mu$ l de RPMI 0,1% de BSA por pocillo. Las

células fueron pre-tratadas o no con GF-I (3,5  $\mu$ M) durante 1h a 37°C, y posteriormente estimuladas o no con PDBu (200nM) 15min a 37°C. Finalizados los tratamientos, aspiramos cuidadosamente el medio y lavamos una vez con PBS, tras lo cual procedimos a fijar las células que habían quedado adheridas con 4% PFA durante 20min a 4°C. Lavamos nuevamente dos veces con PBS y permeabilizamos con 2% de metanol en PBS durante 2min a -20°C. Finalmente teñimos con Cristal Violeta durante 20min y, tras sucesivos lavados con agua, eluimos el colorante con SDS 1%, y medimos la absorbancia a 595nm. Para cada experimento se realizaron dos transfecciones transitorias independientes de cada construcción y se hicieron cuadruplicados de cada condición por placa.

### M15- Ensayos de agregación

En el caso de los ensayos de agregación en respuesta a PDBu, las células Peer, transfectadas 48h antes con las distintas construcciones GFP, GFP-PKDwt, GFP-PKDca, GFP-PKDkm fueron ficolizadas y resuspendidas en medio completo a una concentración de 2x10<sup>6</sup> céls/ml, sembrándose 100 $\mu$ l por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano, con cuadruplicados de cada condición. Tras añadir el PDBu, se realizaron fotos de los distintos pocillos a distintos tiempos con los objetivos 10x y 20x, y se tomaron 10 $\mu$ l para los posteriores contajes en el hemocitómetro o cámara de Neubauer del número de células libres, de células totales así como de células agregadas en cada caso.

El porcentaje de agregación se calculó como el cociente del número de células agregadas frente al número de células totales multiplicado por 100. Se consideraron células agregadas todas aquellas que no estaban aisladas (no libres) y que formaban contacto con otra u otras células. El tamaño así como el número de agregados no se tomó en cuenta.

En el caso de los ensayos de agregación basal (sin estímulo) o en respuesta al Ac pro-agregatorio HP2/19, las células Peer transfectadas 48h antes

fueron ficolizadas y posteriormente seleccionadas mediante separaciones celulares de alta velocidad o *cell sorting*, realizadas en el citómetro de flujo *FACS Vantage SE*. Tras la selección, las poblaciones control GFP<sup>+</sup> y GFP-PKDwt<sup>+</sup> fueron resuspendidas en medio completo a una concentración de 1x10<sup>6</sup> céls/ml, sembrándose 100µl por pocillo. A continuación, las células fueron tratadas o no con 10µl del Ac anti-ICAM-3 TP1/24 o con 10µl del Ac anti-ICAM-3 proagregatorio HP2/19, según el caso. La agregación celular se determinó mediante la realización de fotos de los pocillos con los objetivos 4x y 10x a distintos tiempos.

Para los ensayos de agregación con el Ac anti-Tmb de Kidins220, las células Peer sin transfectar fueron sembradas a una concentración de 2x10<sup>6</sup> céls/ml en ausencia o presencia del Ac anti-Tmb de Kidins220 (dil. 1/20), y posteriormente estimuladas a las 20h con PDBu (200nM). La agregación celular se determinó mediante la realización de fotos de los distintos pocillos con los objetivos 4x y 10x a distintos tiempos.

### **M16- Ensayos de microscopía confocal *in vivo***

Para los ensayos de microscopía confocal *in vivo*, las células JHM1-2.2 transfectadas con pEGFPBos o pEGFPBosPKDwt fueron ficolizadas y resuspendidas a 9x10<sup>5</sup> céls/ml en medio completo y sembradas en placas p35 para estudios *in vivo* que llevan incorporado un cristal en el fondo. Las placas fueron montadas en el microscopio Confocal Espectral *Leica TCS SP2* y tras 15min de espera para dejar aposentarse a las células, se tomaron imágenes cada 5min durante 30min previo a la estimulación con medio completo (control) o con una dilución final 1/20 del Ac HP2/19, tras la cual se siguieron tomando imágenes a intervalos de 5min durante 2h más.

Las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas con el programa *Leica Confocal Software versión Lite* de *Leica Microsystem* y con el programa *Adobe Photoshop7.0* de *Adobe Systems Inc.*





## **RESULTADOS**



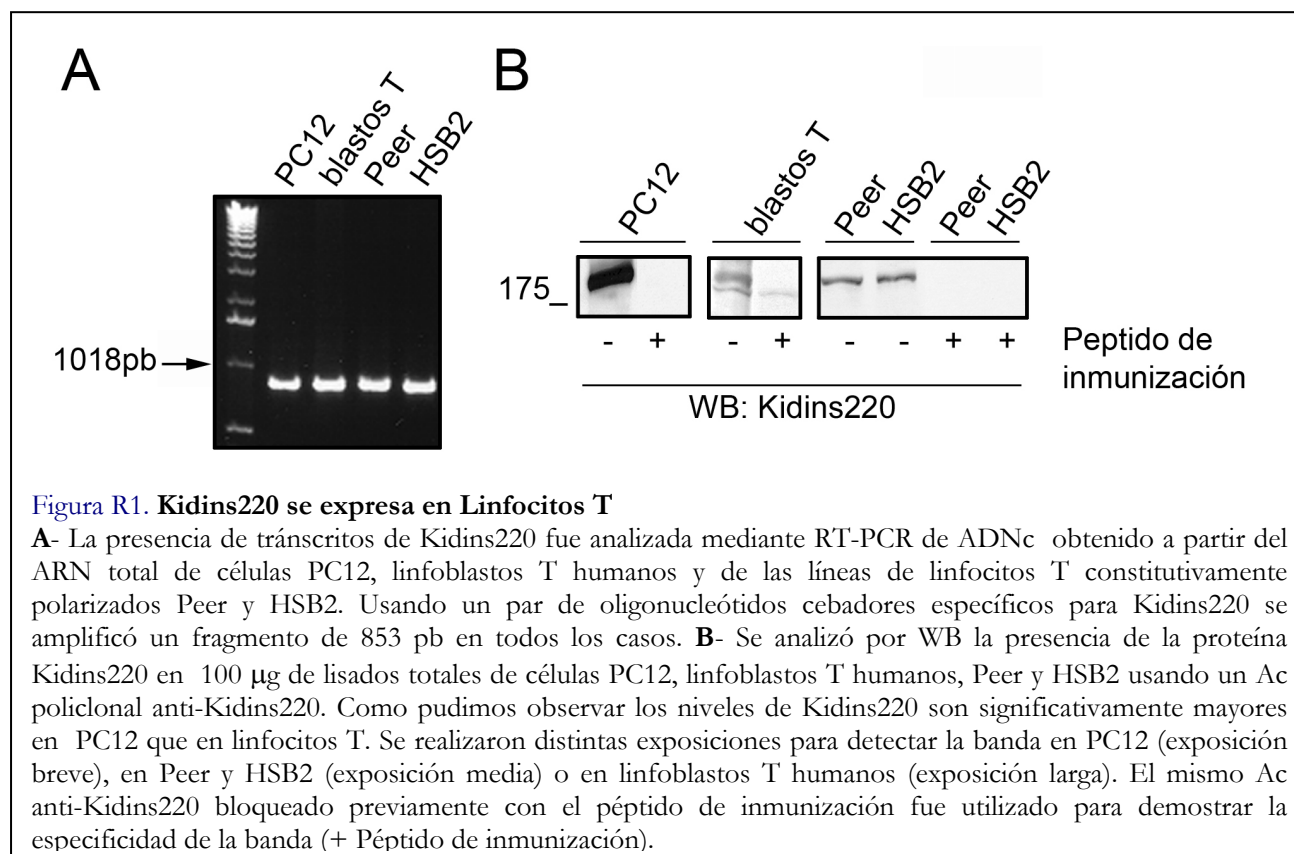
## R1- Kidins220 se expresa en linfocitos T

Kidins220 es una proteína integral de membrana recientemente identificada cuya función es actualmente desconocida. Fue descubierta inicialmente en células de origen nervioso como primer sustrato fisiológico de PKD1<sup>(107)</sup>, y como proteína efectora de las vías de señalización de los receptores de neurotrofinas y efrinas<sup>(132)</sup>. En células nerviosas, Kidins220 presenta una elevada expresión, encontrándose enriquecida en los extremos de las neuritas y en el cono de crecimiento axonal<sup>(28, 107)</sup>. Posteriormente hemos demostrado que Kidins220 se expresa también en células del sistema inmune, concretamente en células dendríticas humanas<sup>(221)</sup>. Nos propusimos pues examinar la presencia de Kidins220 en linfocitos T.

Usando un par de oligonucleótidos cebadores específicos para la amplificación de una secuencia única de Kidins220 humano, analizamos su expresión

por RT-PCR a partir del ADNc de linfoblastos T y de las líneas de linfocitos T constitutivamente polarizados Peer y HSB2. Como control positivo usamos ADNc de células PC12, donde Kidins220 fue clonado. En todos los casos, se amplificó una banda de 853 pb (Fig. R1A) cuya secuenciación demostró que los linfocitos T expresan el ARNm de Kidins220.

A continuación estudiamos la presencia de Kidins220 a nivel de proteína. Para ello analizamos por WB 100µg de lisados totales de linfoblastos T, Peer, HSB2 y PC12 utilizando un Ac policlonal que reconoce específicamente la región C-terminal de Kidins220. Como se observa en la figura R1B, se detectó una banda de aproximadamente 220 kDa correspondiente a Kidins220 en todas las líneas de linfocitos T estudiadas. La pre-absorción del antisuero con el péptido de inmunización bloqueaba completamente el reconocimiento de dicha banda, demostrando así su especificidad. Este resultado certifica la presencia de la proteína Kidins220 en linfoblastos T así como en las dos líneas de linfocitos estudiadas, si bien los niveles

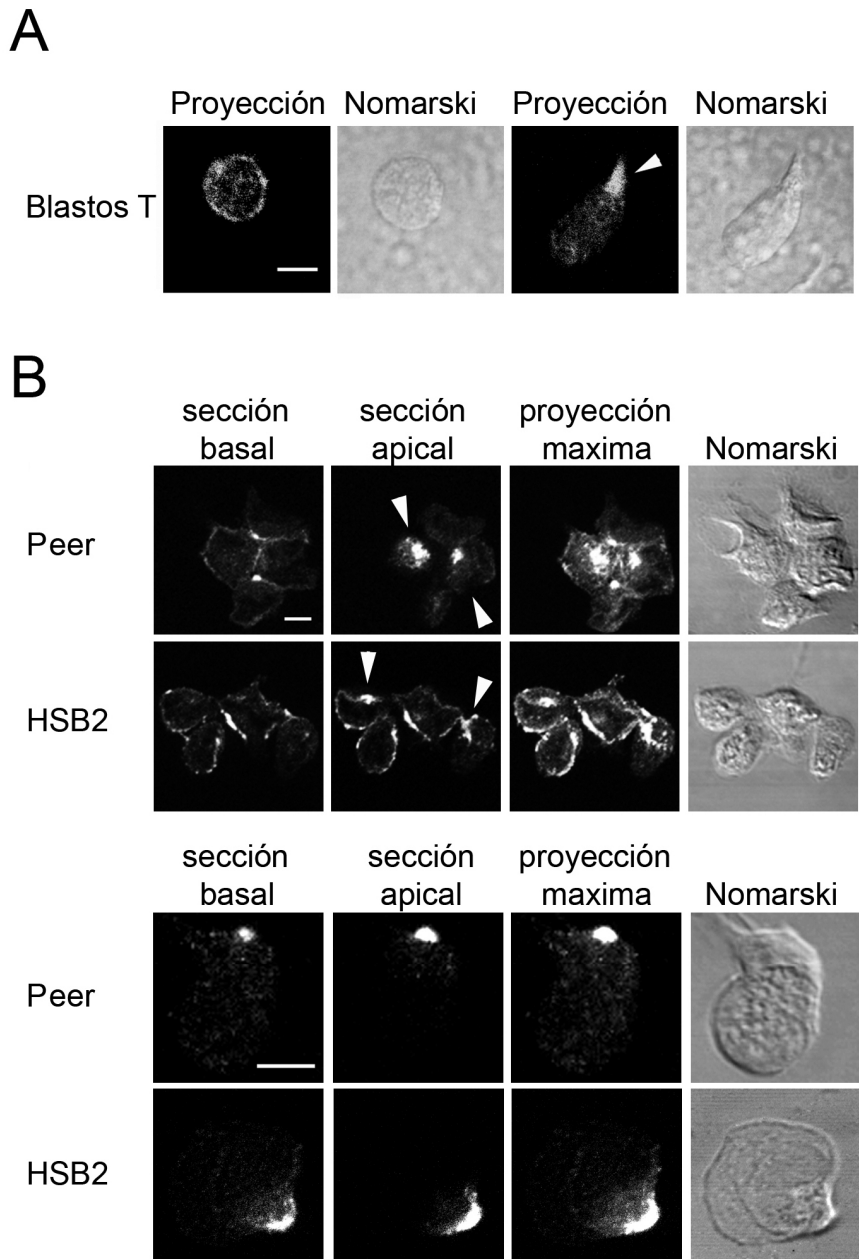


**Figura R1. Kidins220 se expresa en Linfocitos T**

**A-** La presencia de transcritos de Kidins220 fue analizada mediante RT-PCR de ADNc obtenido a partir del ARN total de células PC12, linfoblastos T humanos y de las líneas de linfocitos T constitutivamente polarizados Peer y HSB2. Usando un par de oligonucleótidos cebadores específicos para Kidins220 se amplificó un fragmento de 853 pb en todos los casos. **B-** Se analizó por WB la presencia de la proteína Kidins220 en 100 µg de lisados totales de células PC12, linfoblastos T humanos, Peer y HSB2 usando un Ac policlonal anti-Kidins220. Como pudimos observar los niveles de Kidins220 son significativamente mayores en PC12 que en linfocitos T. Se realizaron distintas exposiciones para detectar la banda en PC12 (exposición breve), en Peer y HSB2 (exposición media) o en linfoblastos T humanos (exposición larga). El mismo Ac anti-Kidins220 bloqueado previamente con el péptido de inmunización fue utilizado para demostrar la especificidad de la banda (+ Péptido de inmunización).

de expresión de la proteína son significativamente menores en todos los casos que los detectados en células PC12.

**R2- Kidins220 se localiza en el urópodo de linfocitos T polarizados**

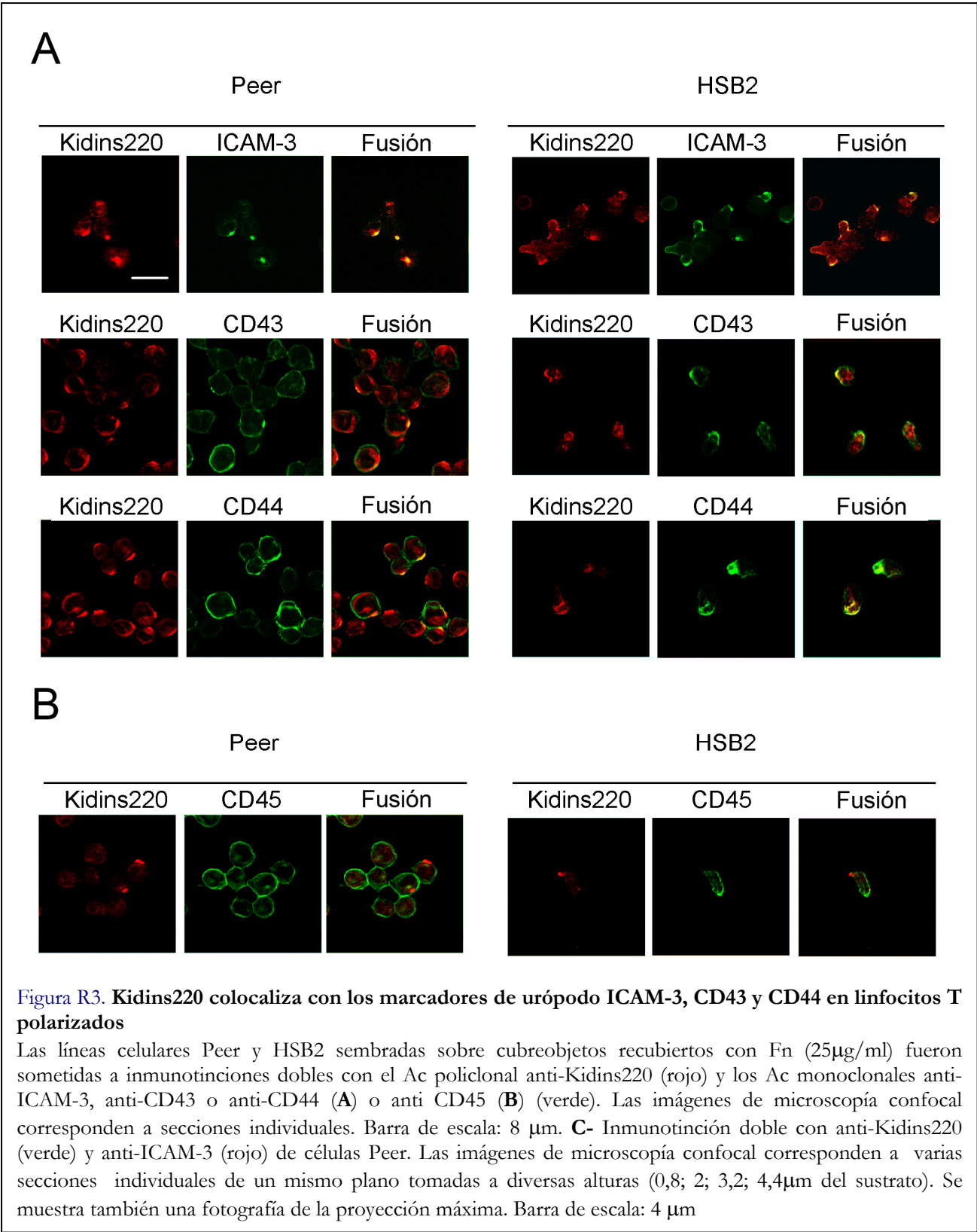


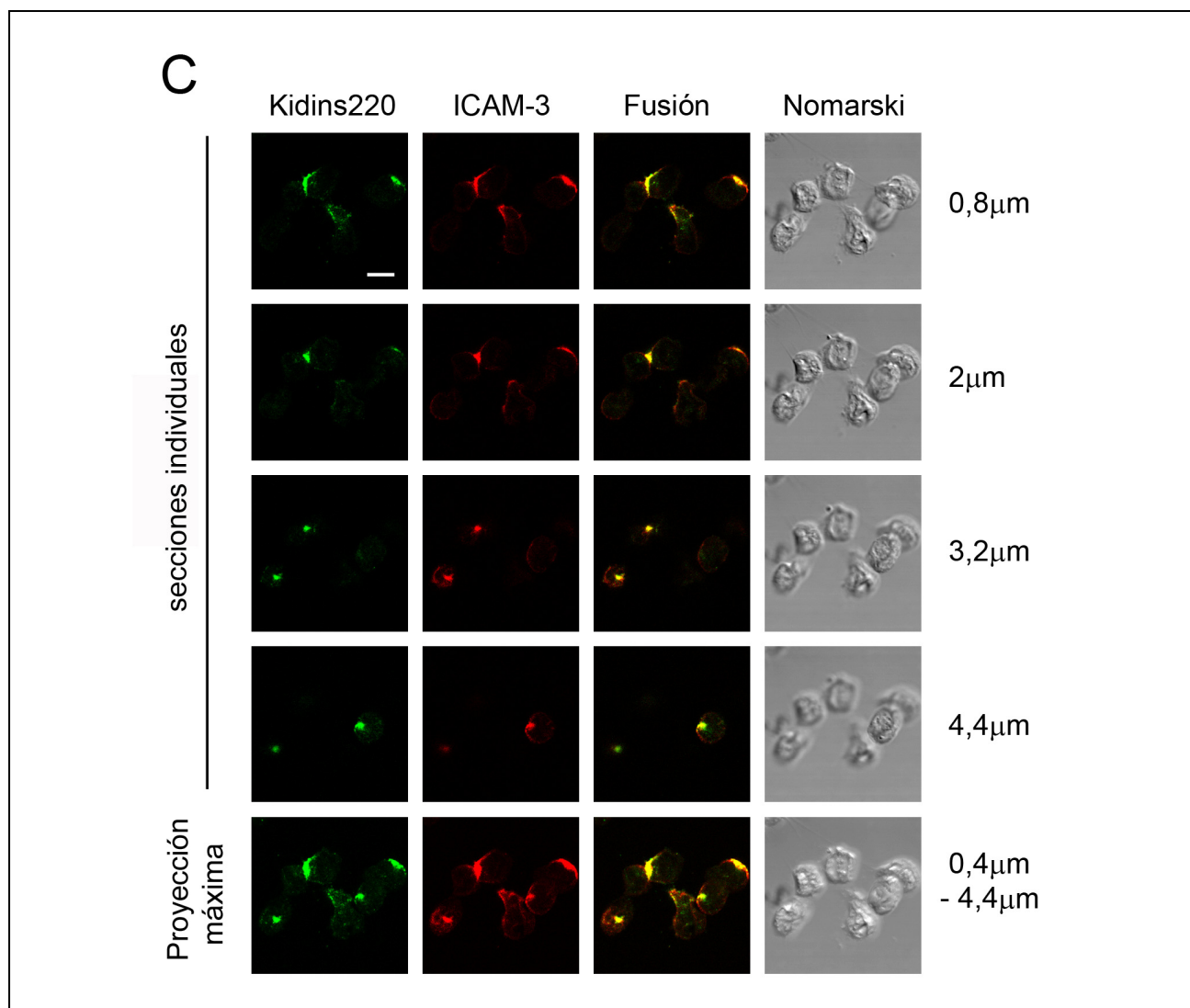
**Figura R2. Localización de Kidins220 en linfocitos T no polarizados y polarizados**  
**A-** Linfoblastos T no polarizados y polarizados crecidos en medio completo en presencia de 50U/ml de IL-2 y sembrados sobre cubreobjetos recubiertos con Fn (25µg/ml) fueron teñidos con el Ac policlonal para Kidins220. Las imágenes de microscopía confocal corresponden a proyecciones máximas. Una punta de flecha señala la estructura protuberante trasera. Barra de escala: 2 µm. **B-** Las líneas de células T constitutivamente polarizadas Peer y HSB2 fueron sembradas sobre cubreobjetos recubiertos de fibronectina y teñidas con el Ac policlonal para Kidins220. En ambos casos las imágenes de microscopía confocal muestran secciones basales (a 0,6µm del sustrato), secciones apicales (a 3µm del sustrato) y proyecciones máximas tanto de un grupo de células (paneles superiores) como de una célula individual (paneles inferiores). Barras de escala: 2 µm.



Ya hemos mencionado previamente que la distribución celular de Kidins220 en células polarizadas, tales como las neuronas o las células PC12 tratadas con NGF, no es homogénea <sup>(28, 107)</sup>. Así

mismo en células dendríticas inmaduras Kidins220 aparece concentrado mayoritariamente en el frente de avance <sup>(221)</sup>. En estado de reposo, los linfocitos son células

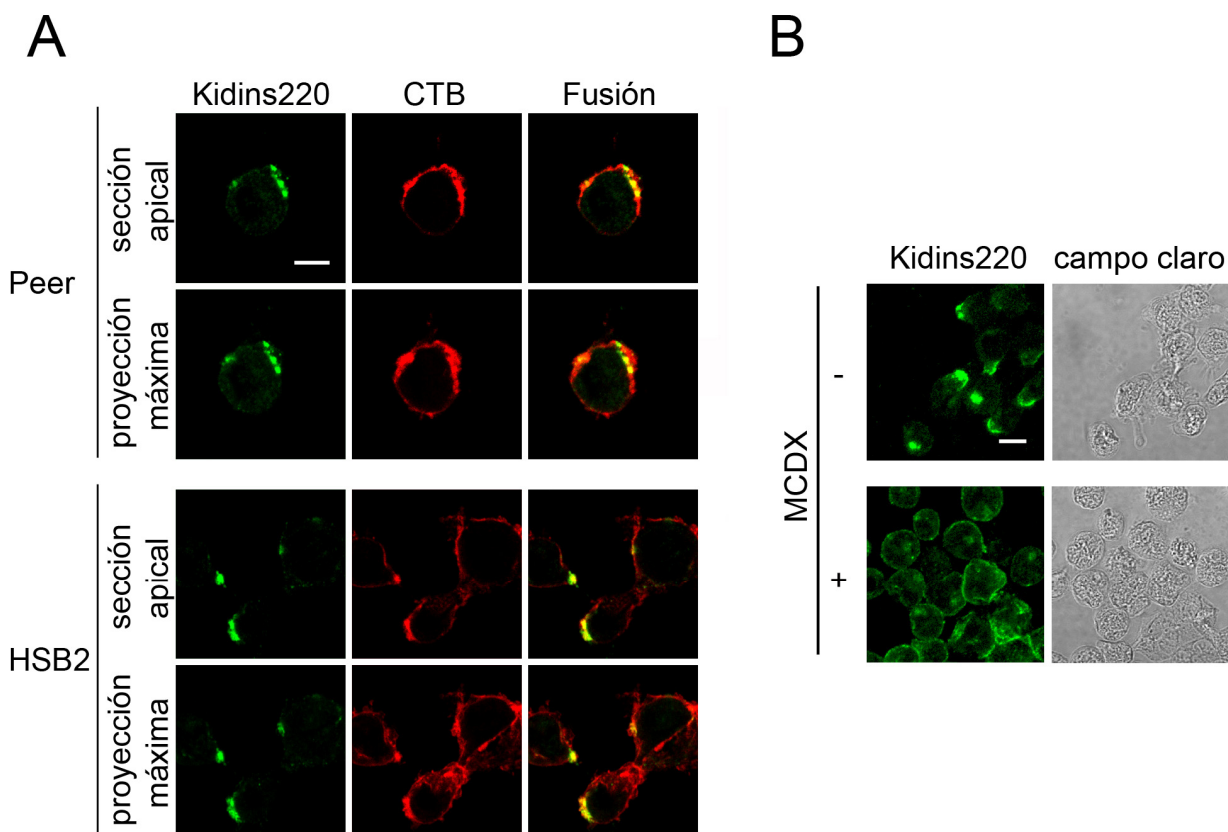




esféricas no polarizadas, sin embargo su activación en respuesta a distintos estímulos quimioatrayentes provoca toda una serie de reordenamientos morfológicos y cito-esqueléticos dando lugar a la adquisición de una morfología polarizada. De esta forma, los linfocitos T activados y migratorios presentan dos regiones bien diferenciadas: El frente de avance y el urópodo. Nos propusimos determinar mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal la distribución de Kidins220 en células T polarizadas. Estudiamos primero su localización en linfoblastos T humanos proliferantes crecidos en presencia de IL-2 y sembrados en cubres recubiertos con Fn (Fig. R2A). En linfoblastos T esféricos, Kidins220 presentaba una tinción homogéneamente distribuida por toda la membrana plasmática (Fig. R2A paneles de la

izquierda). Por el contrario en la población de linfoblastos con morfología polarizada, y de forma opuesta a lo previamente observado en células dendríticas, Kidins220 se localizaba en la parte trasera de la célula en lo que podría constituir el urópodo (Fig. R2A paneles de la derecha, el urópodo está señalado con una punta de flecha).

A continuación decidimos estudiar la localización de Kidins220 en las células Peer y HSB2, líneas de linfocitos T humanos constitutivamente polarizados. Como puede observarse en la figura R2B, tanto en Peer como en HSB2 Kidins220 presentaba una distribución polarizada, concentrándose principalmente en una protuberancia que proyecta hacia arriba, lejos de la zona de contacto con el sustrato. Esta distribución de Kidins220 concentrada



**Figura R4. Importancia de las balsas lipídicas ricas en GM1 en la distribución de Kidins220 en linfocitos T polarizados**

**A-** Las balsas lipídicas ricas en GM1 de las células Peer (paneles superiores) y HSB2 (paneles inferiores) fueron marcadas mediante la unión *in vivo* de CTB conjugada al fluoróforo Texas Red. Tras la fijación, las células fueron teñidas con el Ac policlonal para Kidins220 (verde). Las imágenes de microscopía confocal corresponden a secciones individuales apicales (a 2,4  $\mu\text{m}$  del sustrato) y proyecciones máximas. Barra de escala: 2  $\mu\text{m}$ . **B-** Las células Peer fueron tratadas (+) o no (-) con MCDX (7,5mM) durante 1h a 37°C, fijadas y posteriormente teñidas con anti-Kidins220. El campo claro nos permite comprobar la morfología de las células. Las imágenes de microscopía confocal corresponden a proyecciones máximas. Barra de escala: 4  $\mu\text{m}$ .

en esta región sugería de nuevo su localización en el urópodo. Las imágenes de microscopía confocal de secciones basales (Fig. R2B paneles superiores) muestran que Kidins220 también está presente, aunque en menor grado, en otras áreas de la membrana, y muy particularmente en las zonas de contacto célula-célula.

Para terminar de definir con exactitud la región en la cual Kidins220 se concentra, y poder asegurar que dicha estructura corresponde al urópodo, analizamos la co-localización de Kidins220 con distintas proteínas integrales de membrana que se agrupan dentro de esta estructura. Las inmunotinciones dobles para

Kidins220 y los marcadores moleculares de urópodo ICAM-3, CD43 y CD44 realizadas tanto en células Peer como en HSB2 demostraron claramente la co-localización de Kidins220 con todos ellos (Fig. R3A y R3C). A su vez, las imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencias dobles para Kidins220 y CD45 -proteína integral de membrana que no está presente en el urópodo- no mostraban co-localización alguna de ambas proteínas (Fig. R3B).

Los resultados obtenidos demuestran de forma clara la localización de Kidins220 en el urópodo de los linfocitos T polarizados.

### **R3- Kidins220 está embebido en *lipid rafts* enriquecidos en GM1 e interacciona con caveolina-1 en linfocitos T polarizados**

#### **R3.1- Importancia de las balsas lipídicas ricas en GM1 en la distribución de Kidins220 en linfocitos T polarizados**

Los *lipid rafts* o balsas lipídicas son microdominios de membrana que contienen altas concentraciones de colesterol y de esfingolípidos, constituyendo regiones de membrana con una alta ordenación. Varios estudios previos han demostrado que el urópodo acumula un patrón específico de *lipid rafts*, que difieren en su composición a los que se presentan en el frente de avance de los linfocitos T polarizados <sup>(81, 82, 180)</sup>. Así las balsas lipídicas concentradas en dicha estructura de la parte trasera de las células T polarizadas presentan una alta concentración de GM1. Estos trabajos sugieren que la distribución diferencial de las balsas lipídicas en diferentes compartimentos es una de las causas principales de la redistribución de las distintas proteínas en linfocitos T migratorios polarizados.

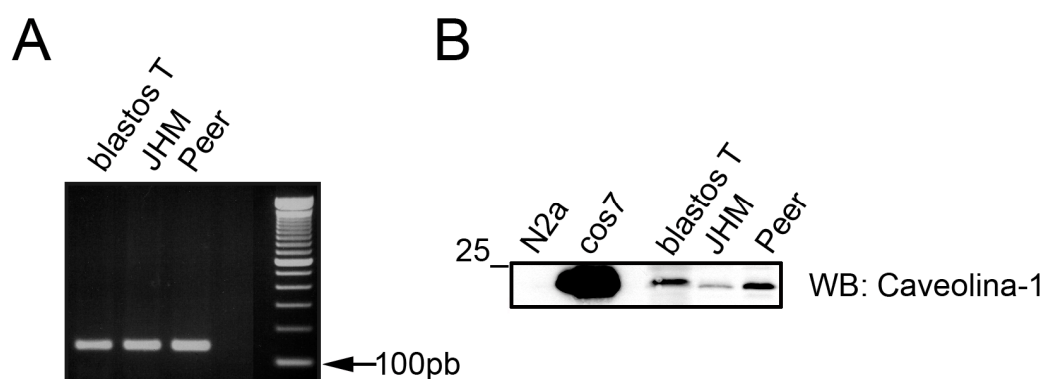
Para determinar el grado de solapamiento entre la localización concentrada en el urópodo de Kidins220 y la distribución de las balsas lipídicas ricas en GM1, llevamos a cabo un ensayo de unión *in vivo* de CTB conjugada al fluoróforo *Texas Red*, un método extensamente utilizado para la detección de GM1 en la membrana plasmática <sup>(28, 81, 82, 180)</sup>. Tras la unión *in vivo* de la CTB procedimos a la fijación y permeabilización de las células para la posterior inmunotinción con el Ac policlonal para Kidins220. Tal como se puede observar en la figura R4A, el análisis mediante microscopía confocal muestra una co-localización sustancial de Kidins220 con las zonas marcadas con CTB, tanto en Peer como en HSB2. Si bien es cierto que la unión de CTB era menos restringida que la distribución de Kidins220 (Fig. R4A proyecciones máximas), se observó (sobre todo en las secciones apicales) una acumulación de CTB en la región correspondiente al urópodo donde se

encuentra Kidins220. Este resultado indica claramente la asociación de Kidins220 con las balsas lipídicas enriquecidas en GM1 presentes en el urópodo.

Diversos estudios con agentes secuestradores de colesterol, tales como la MCDX, que desorganizan las balsas lipídicas de la membrana, llegaron a la conclusión de que la reducción de colesterol en la membrana plasmática inhibe la polarización y migración de los leucocitos <sup>(81, 180, 221)</sup>. Decidimos por tanto analizar mediante microscopía confocal el efecto de los tratamientos con MCDX en la localización de Kidins220 en la línea celular Peer. Como se muestra en la figura R4B, al tratar las células con MCDX Kidins220 perdía su localización típica en el urópodo, adquiriendo una distribución uniforme a lo largo de la membrana plasmática. Este resultado nos proporcionó las primeras evidencias de que la pérdida de polaridad de los linfocitos T podría provocar la redistribución de Kidins220 fuera de los compartimentos específicos de la parte trasera de dichas células.

#### **R3.2- Los linfocitos T expresan caveolina-1**

Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática (de 50 a 100 nm de diámetro) consideradas como un subtipo particular de *lipid rafts* presentes en numerosos y distintos tipos celulares <sup>(250)</sup>. Estas invaginaciones se mantienen estructural y morfológicamente gracias a las caveolinas, una familia de proteínas palmitoiladas con una alta afinidad por el colesterol. Está ampliamente aceptado que los linfocitos no presentan caveolas debido a la falta de expresión de caveolina en dichas células <sup>(5, 68)</sup>. Sin embargo, se ha demostrado recientemente la expresión de caveolina-1 en algunas líneas celulares derivadas de linfocitos T de leucemias humanas mediante el uso de diversos Ac específicos <sup>(92, 278)</sup>. Con objeto de esclarecer si los linfocitos T expresan caveolina-1, decidimos llevar a cabo un análisis por RT-PCR usando un par de oligonucleótidos cebadores específicos para la amplificación de



**Figura R5. Los linfocitos T expresan caveolina-1**

**A-** La presencia de transcritos de caveolina-1 fue analizada mediante RT-PCR de ADNc obtenido a partir del ARN total de linfoblastos T humanos y de las líneas de linfocitos T JHM1-2.2 y Peer. Usando un par de oligonucleótidos cebadores específicos para caveolina-1, un fragmento de 137 pb fue amplificado en todos los casos. **B-** Se analizó por WB la presencia de la proteína caveolina-1 en 100 µg de lisados totales de linfoblastos T humanos y células JHM1-2.2 y Peer usando un Ac policlonal anti-caveolina-1. Se detectó una banda de aproximadamente 22kDa. Las líneas celulares COS-7 y N2a fueron utilizadas como control positivo y negativo respectivamente.

caveolina-1 humana a partir del ADNc de linfoblastos T y de las líneas celulares Peer y JHM1-2.2. Como puede observarse en la figura R5A, se amplificó una banda con el tamaño esperado de 137 pb en todos los casos. La secuenciación de los productos amplificados por PCR confirmó que estos corresponden a un fragmento del ARNm de caveolina-1 humana. Procedimos entonces a comprobar la presencia de caveolina-1 a nivel de proteína en dichas células. Para ello, los lisados de linfoblastos T, así como de las líneas Peer y JHM1-2.2, fueron analizados por WB con un Ac específico para caveolina-1. Como se muestra en la figura R5B, aunque de forma poco abundante, se detectó una banda de 22kDa correspondiente a caveolina-1. La línea celular COS-7 y la línea celular de neuroblastoma N2a fueron utilizadas como control positivo y negativo de expresión de caveolina-1 respectivamente.

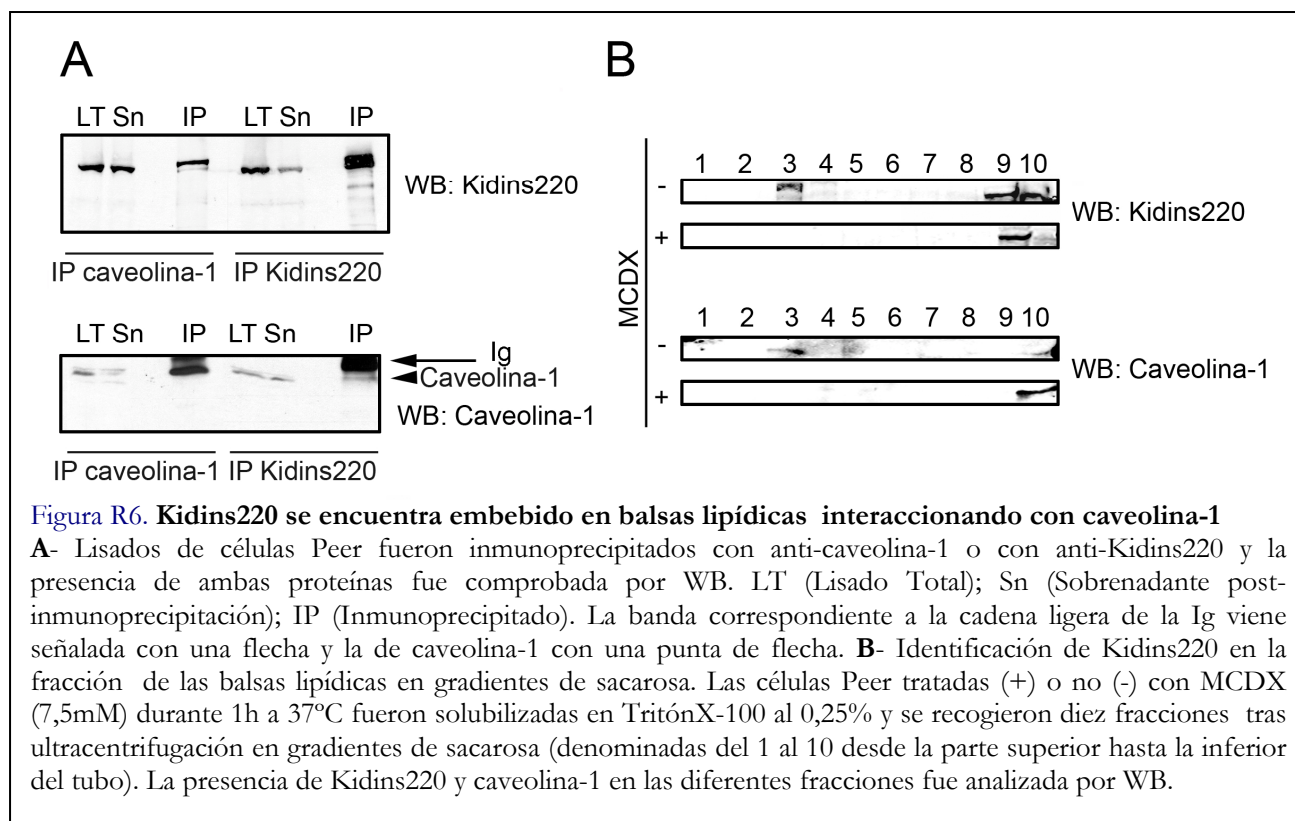
### **R3.3- Kidins220 se encuentra embebido en balsas lipídicas e interacciona con caveolina-1**

La presencia de Kidins220 en las balsas lipídicas ricas en GM1 de los linfocitos T polarizados y el descubrimiento de que dichas células expresan

caveolina-1 nos llevó a estudiar la posible interacción entre ambas proteínas. Para ello, llevamos a cabo inmunoprecipitaciones de lisados de células Peer con Ac anti-Kidins220 y anti-caveolina-1 y analizamos por WB la presencia respectiva de caveolina-1 y de Kidins220 en los inmunoprecipitados. Como se muestra en la figura R6A (panel superior), pudimos detectar altos niveles de Kidins220 en los inmunoprecipitados de caveolina-1. De igual modo, comprobamos que la banda de caveolina-1 se presentaba a su vez en los inmunoprecipitados de Kidins220 (Fig. R6A, panel inferior). Estos resultados demuestran que Kidins220 y caveolina-1 interaccionan en linfocitos T polarizados.

Las balsas lipídicas ricas en colesterol y otros esfingolípidos, así como las proteínas contenidas en ellas (entre las que se incluyen las caveolinas, diversas proteínas integrales de membrana así como las ancladas por GPI y otras moléculas señalizadoras), son resistentes a la extracción con detergentes no iónicos. De esta forma se pueden aislar fácilmente como una fracción ligera de membrana o de baja densidad por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa tras la solubilización de las células con Tritón





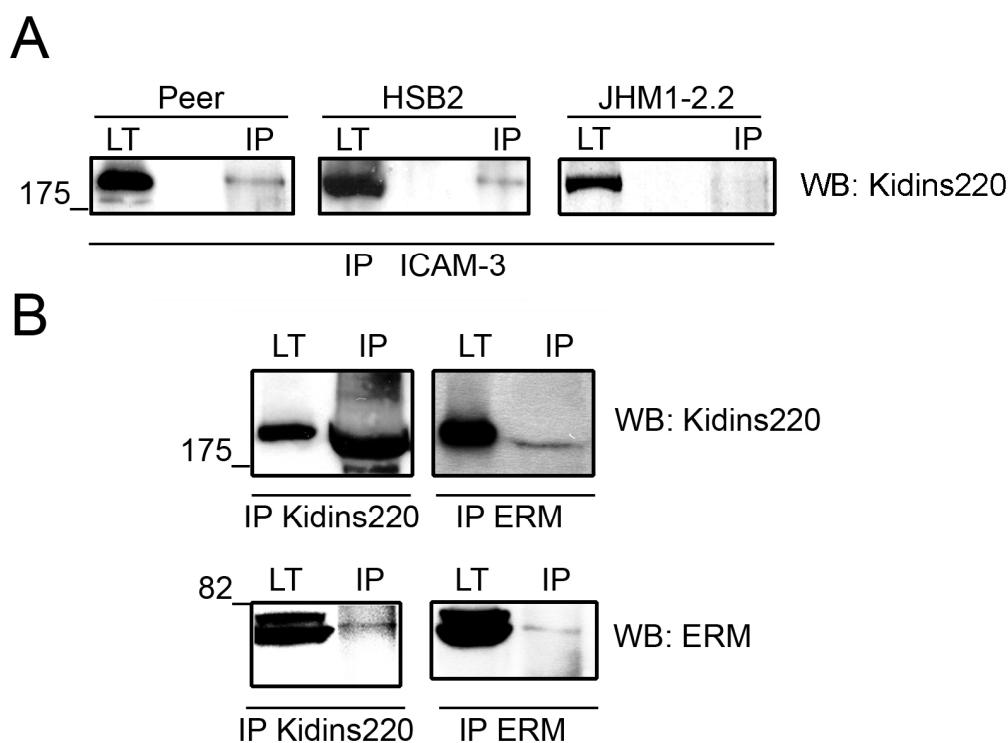
**Figura R6. Kidins220 se encuentra embebido en balsas lipídicas interaccionando con caveolina-1**

**A-** Lisados de células Peer fueron inmunoprecipitados con anti-caveolina-1 o con anti-Kidins220 y la presencia de ambas proteínas fue comprobada por WB. LT (Lisado Total); Sn (Sobrenadante post-inmunoprecipitación); IP (Inmunoprecipitado). La banda correspondiente a la cadena ligera de la Ig viene señalada con una flecha y la de caveolina-1 con una punta de flecha. **B-** Identificación de Kidins220 en la fracción de las balsas lipídicas en gradientes de sacarosa. Las células Peer tratadas (+) o no (-) con MCDX (7,5mM) durante 1h a 37°C fueron solubilizadas en TritónX-100 al 0,25% y se recogieron diez fracciones tras ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (denominadas del 1 al 10 desde la parte superior hasta la inferior del tubo). La presencia de Kidins220 y caveolina-1 en las diferentes fracciones fue analizada por WB.

X-100. Decidimos pues usar este método para estudiar bioquímicamente la asociación de Kidins220 a dichos microdominios en linfocitos T polarizados. Así las células Peer, sin tratar o tratadas con MCDX, fueron solubilizadas en Tritón X-100 para aislar los *lipid rafts* por ultracentrifugación de los extractos en gradientes de sacarosa. El fraccionamiento del gradiente realizado con los extractos procedentes de células Peer sin tratar, y su posterior análisis por WB, mostró que una porción significativa de Kidins220 flotaba en la fracción 3 de baja densidad, de igual forma que la caveolina-1. En dichos extractos Kidins220 se presentaba también en las fracciones solubles 9 y 10 (Fig. R6B). La preincubación de las células con MCDX provocó la desaparición total de Kidins220 y caveolina-1 de las fracciones de baja densidad, apareciendo ambas proteínas en fracciones más solubles en el fondo del gradiente (Fig. R6B). Estos resultados confirman que Kidins220 y caveolina-1 se encuentran embebidas en balsas lipídicas de los linfocitos T polarizados.

#### R4- Kidins220 interacciona con ICAM-3 y con la familia de proteínas ERM

Como bien pudimos comprobar por microscopía confocal en las inmunofluorescencias realizadas tanto en Peer como en HSB2 (Fig. R3A), el grado de co-localización de Kidins220 e ICAM-3 es prácticamente total (Fig. R3C). Por esta razón, y dado el importante papel desempeñado por ICAM-3 en la función de los linfocitos T así como en la respuesta inmune <sup>(186)</sup>, decidimos centrarnos en el estudio de la posible asociación entre Kidins220 y esta molécula de adhesión. Para ello llevamos a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación en lisados de células Peer y HSB2. El análisis por WB reveló la presencia de Kidins220 en los inmunoprecipitados de ICAM-3 en ambas líneas celulares (Fig. R7A paneles izquierdo y central). La presencia de ICAM-3 en los inmunoprecipitados de Kidins220 no pudo ser verificada puesto que no existen Ac específicos anti-ICAM-3 capaces de reconocer la molécula por WB. Este resultado demuestra que en las dos líneas de linfocitos T constitutivamente polarizados estudiadas



**Figura R7. Kidins220 interacciona con ICAM-3 y con la familia de proteínas ERM**

**A-** Lisados celulares de las líneas Peer, HSB2 y JHM1-2.2 fueron inmunoprecipitados con anti-ICAM-3 (IP ICAM-3) y la presencia de Kidins220 en los inmunoprecipitados fue comprobada por WB. **B-** Lisados celulares de la línea Peer fueron inmunoprecipitados con anti-Kidins220 (paneles izquierdos) o con anti-ERM (paneles derechos) y la presencia de ambas proteínas fue comprobada por WB.

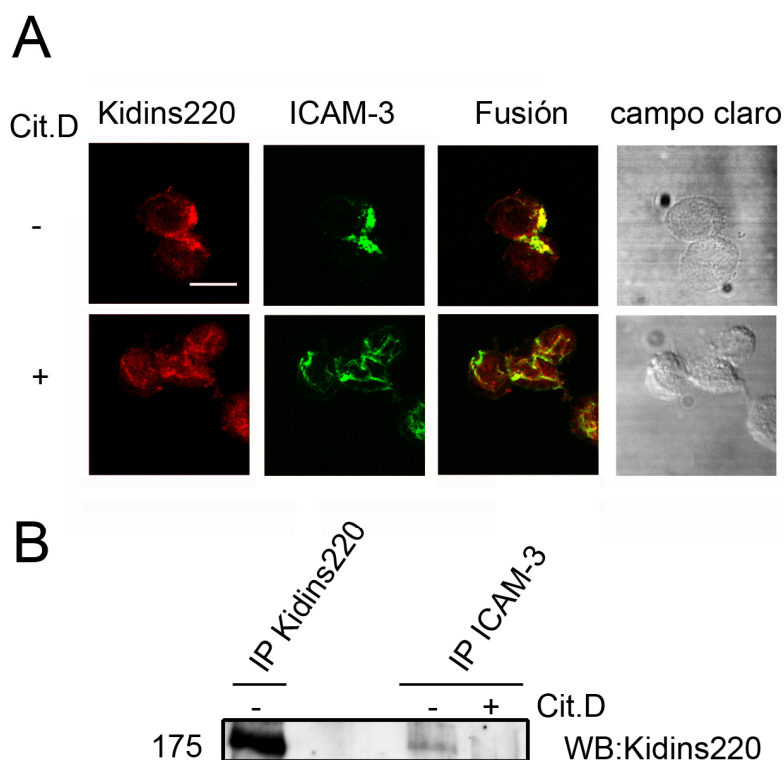
Kidins220 no solo co-localiza (Fig. R3A y C) sino que también interacciona con ICAM-3. A su vez dicha interacción parece depender de la polarización celular puesto que no se observaba la presencia de Kidins220 en inmunoprecipitados de ICAM-3 de la línea de células T no polarizadas JHM1-2.2 (Fig. R7A, panel derecho).

Varias moléculas de adhesión transmembrana selectivamente compartimentalizadas en el urópodo, como ICAM-1, -2 y -3, CD43, CD44 y PSGL-1, interaccionan con las proteínas ERM. Esta familia de proteínas juega un papel clave en la distribución polarizada de estas moléculas así como en la formación del urópodo<sup>(141, 237, 238, 305)</sup>. Decidimos por tanto esclarecer si Kidins220, como nueva proteína transmembrana del urópodo, era capaz de interaccionar con las proteínas ERM. Se prepararon para ello inmunoprecipitados de Kidins220 y de

proteínas ERM de lisados de células Peer que fueron analizados por WB con Ac anti-ERM y anti-Kidins220 respectivamente. Los resultados obtenidos (Fig. R7B) demuestran que Kidins220 también interacciona con las proteínas ERM, al igual que la mayor parte de las proteínas transmembranales componentes del urópodo descritas hasta hoy.

### **R5- La despolarización de células T altera la localización de Kidins220 en el urópodo y afecta a su asociación con ICAM-3**

Tras determinar la localización de Kidins220 en linfocitos T constitutivamente polarizados y estudiar su asociación con distintos componentes del urópodo, decidimos analizar el efecto de distintos estímulos que alteran la polaridad celular tanto en la distribución de Kidins220 como en su interacción con ICAM-3.



**Figura R8. La desorganización del CK de actina altera la localización polarizada de Kidins220 y disminuye su asociación con ICAM-3**

**A-** Las células Peer sin tratar (-) o tratadas (+) con Cit.D (5µg/ml) durante 30min fueron sometidas a una inmunotinción doble con anti-Kidins220 (rojo) y anti-ICAM-3 (verde). Nótese que la distribución polarizada de ambas proteínas se pierde tras el tratamiento con Cit.D. El campo claro nos permite comprobar la morfología de las células. Las imágenes de microscopía confocal corresponden a proyecciones máximas. Barra de escala: 4 µm. **B-** Inmunoprecipitados de ICAM-3 (IP ICAM-3) fueron preparados a partir de células Peer tratadas (+) o no (-) con Cit.D y la presencia de Kidins220 fue analizada por WB. Un inmunoprecipitado de Kidins220 (IP Kidins220) se corrió en paralelo como control positivo.

#### **R5.1- La desorganización del CK de actina altera la distribución de Kidins220 e ICAM-3, disminuyendo drásticamente su asociación**

El CK de actina es fundamental en el control de la morfología, la polarización y la motilidad celular <sup>(289)</sup>. Así, en linfocitos T, el uso de agentes despolimerizantes de F-actina impide la formación del urópodo <sup>(179)</sup>. Quisimos por lo tanto analizar como afectaba el tratamiento con Cit.D a la localización de Kidins220 en nuestro sistema celular.

Como se puede observar en la figura R8A, tanto la distribución polarizada de Kidins220 como de ICAM-3 se perdía tras el tratamiento con Cit.D. A continuación, estudiamos la asociación de estas dos moléculas bajo estas circunstancias. Así se realizaron

inmunoprecipitados con Ac anti-ICAM-3 de extractos celulares provenientes de células Peer sin tratar o tratadas con Cit.D, y se analizó la presencia de Kidins220 por WB. De esta forma comprobamos que la desorganización de F-actina con esta droga disminuye drásticamente la interacción de Kidins220 con ICAM-3 (Fig. R8B).

#### **R5.2- Implicación de las vías de PKC en la localización de Kidins220 en el urópodo y su interacción con ICAM-3**

Es ya un hecho establecido que la estimulación de las células T con potentes activadores de PKC, como los é.f, provoca cambios sustanciales en la morfología celular, dando lugar a importantes modificaciones en



la habilidad de los linfocitos para polarizarse, migrar y establecer contactos célula-célula <sup>(14, 255, 271)</sup>. Como parte de nuestro estudio quisimos analizar el efecto de la activación de las vías de PKC por é.f en la polarización de Kidins220 y su interacción con ICAM-3.

Mediante inmunofluorescencias dobles y posterior análisis por microscopía confocal comprobamos que los tratamientos con PDBu durante 15min también provocaban la pérdida de la distribución polarizada de Kidins220 e ICAM-3 tanto en células Peer como en HSB2 (Figs. R9A y R9B paneles de en medio). La pre-incubación de las células con GF-I, inhibidor de PKCs, prevenía los cambios observados tras el tratamiento con PDBu en ambas líneas celulares (Figs. R9A y R9B, paneles inferiores).

Como pudo apreciarse mediante WB en los inmunoprecipitados de ICAM-3 de células Peer, y en concordancia con los resultados de microscopía confocal, la estimulación con PDBu provocaba a su vez una bajada significativa de la interacción entre Kidins220 e ICAM-3 (Fig. R9C). De idéntica manera, el pre-tratamiento con GF-I era capaz de prevenir el efecto del PDBu manteniendo intacta la asociación entre Kidins220 e ICAM-3.

De los resultados expuestos en los apartados R5.1 y R5.2 podemos concluir que estímulos despolarizantes aplicados a células T polarizadas destruyen la localización de Kidins220 e ICAM-3 en el urópodo así como la asociación de estas dos moléculas.

### **R5.3- Estudio del papel de Kidins220 en la distribución polarizada de ICAM-3**

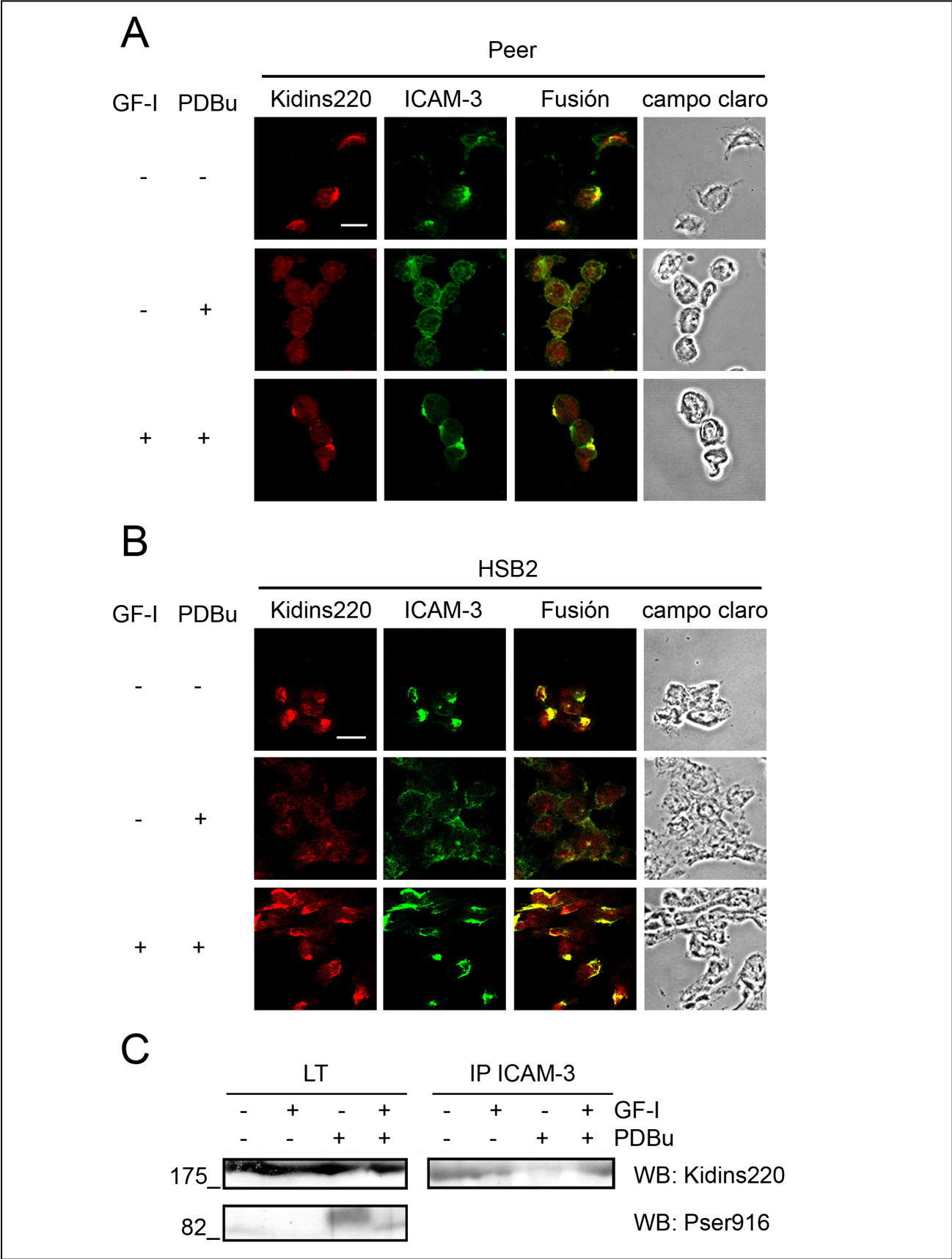
Un trabajo reciente ha resaltado la importancia de una red de proteínas con módulos PDZ en el establecimiento de la polaridad de los linfocitos T y por ende en su capacidad de migración y de formación de la SI <sup>(149)</sup>. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado a su vez la importancia del motivo de unión a proteínas PDZ de PKD1 y PKD2 en la regulación del transporte a la

membrana plasmática de Kidins220 en neuronas y células PC12, sugiriendo la participación de una proteína PDZ en la presencia de Kidins220 en la superficie celular <sup>(233)</sup>. A su vez, Kidins220 presenta un motivo de unión a proteínas PDZ en su extremo C-terminal, un motivo cuya importancia para la correcta localización de Kidins220 en uniones neuromusculares ha sido descrito recientemente <sup>(154)</sup>.

Teniendo en cuenta todos estos hechos y sabiendo que la mayor parte de las moléculas de adhesión presentes en el urópodo presentan colas citoplásmicas cortas mientras que por el contrario Kidins220 dispone de una enorme región intracelular con capacidad para interactuar con proteínas PDZ, nos planteamos la posibilidad de que Kidins220 participara de algún modo en el establecimiento o mantenimiento de la polaridad celular en linfocitos T. La expresión ectópica del ADNc completo de Kidins220 da lugar a una distribución anómala de la proteína (233). Decidimos pues utilizar un vector de expresión en el que habíamos clonado la región C-terminal de Kidins220. La transfección de esta construcción da lugar a una proteína soluble, fusionada a GFP, que contiene el dominio de unión a proteínas PDZ (GFP-Kidins1340). La utilización de esta proteína de fusión nos permitiría por un lado analizar la importancia del dominio C-terminal en la distribución polarizada de Kidins220 y por otro los efectos que tuviese la sobre-expresión de dicho dominio de la proteína sobre la polaridad celular. En relación a este último punto, era plausible que la existencia de niveles elevados de GFP-Kidins1340 (proteína que contiene el dominio de unión a proteínas PDZ) pudiera competir por la unión de proteínas PDZ a la proteína endógena, afectando de este modo a la polaridad de los linfocitos T.

En primer lugar, procedimos a examinar el efecto de la sobre-expresión de GFP-Kidins1340 en la distribución polarizada de ICAM-3 mediante inmunofluorescencias dobles en células Peer. Como se observa en la figura R10A, la sobre-expresión del

dominio C-terminal de Kidins220 no afectaba a la localización en el urópodo de ICAM-3.



**Figura R9. El tratamiento con ésteres de forbol provoca la redistribución de Kidins220 fuera del urópodo y su disociación de ICAM-3 por un mecanismo dependiente de PKC.**

Las líneas celulares Peer (A) y HSB2 (B) sembradas sobre cubreobjetos recubiertos con Fn (25µg/ml) fueron pretratadas (+) o no (-) con GF-I (3,5µM) durante 1h para posteriormente ser estimuladas (+) o no (-) con PDBu (200nM) durante 15min. Dobles tinciones con anti-Kidins220 (rojo) y anti-ICAM-3 (verde) fueron llevadas a cabo. Nótese que ambos tipos celulares la distribución polarizada de ambas proteínas se pierde tras el tratamiento con PDBu y que el pretratamiento con GF-I preserva su polarización. Las imágenes de microscopía confocal corresponden a proyecciones máximas. Barra de escala: 8 µm. C- Inmunoprecipitados de ICAM-3 (IP ICAM-3) fueron preparados a partir de células Peer pretratadas (+) o no (-) con GF-I y posteriormente estimuladas (+) o no (-) con PDBu. La presencia de Kidins220 tanto en los inmunoprecipitados como en los lisados totales fue analizada por WB. El análisis por WB de los lisados totales con anti-Pser916 (panel inferior) se utilizó como control positivo de la activación o inhibición de las vías de PKC por PDBu y GF-I, respectivamente.

Sin embargo, cabe resaltar que GFP-Kidins1340, a pesar de ser soluble, no presentaba una distribución homogénea en el citoplasma celular sino que en la mayoría de los casos (un 75% aproximadamente) aparecía enriquecido en uno u otro polo de las células. Curiosamente, en muchas de las células Peer en las que GFP-Kidins1340 presentaba una distribución parcialmente polarizada este se encontraba principalmente enriquecido en el polo opuesto a donde se acumula ICAM-3 (ver paneles inferiores Fig. R10A y cuantificación en Fig. R10B).

Los resultados obtenidos con esta proteína de fusión demuestran que la sobre-expresión de GFP-Kidins1340 no despolariza células constitutivamente polarizadas como las Peer. Además, estos datos sugieren que el dominio C-terminal de Kidins220 participa en su distribución diferencial en linfocitos T.

### **R6- Kidins220 participa en las adhesiones intercelulares promovidas por ésteres de forbol**

Teniendo en cuenta la localización de Kidins220 en el urópodo y su interacción con ICAM-3, y conociendo la participación de esta estructura y esta molécula de adhesión en el reclutamiento de otros linfocitos <sup>(41)</sup> y en los procesos de adhesión entre células T mediados por integrinas <sup>(29)</sup>, nos propusimos estudiar la posible implicación de Kidins220 en la adhesión intercelular. Como hemos podido comprobar mediante inmunofluorescencia, en linfocitos adheridos entre sí

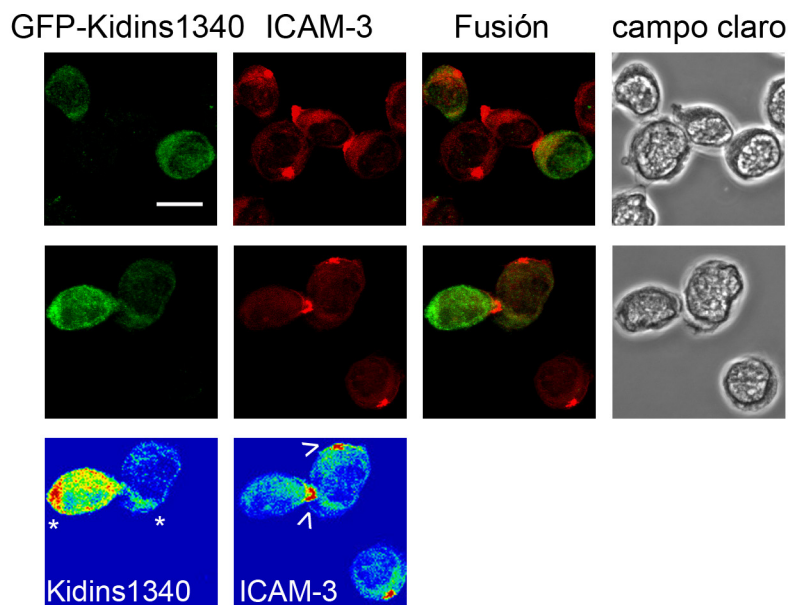
Kidins220 se localiza en gran medida en las zonas de contacto (Fig. R2B paneles centrales y Fig. R11A).

Los ensayos de agregación celular, basados en las propiedades adherentes de los linfocitos han sido realizados frecuentemente en el pasado usando Ac generados contra epítomos de la región extracelular de diversas proteínas transmembranales, permitiendo establecer la participación de muchas de ellas en los procesos de adhesión leucocitaria. Este ha sido el caso de ICAM-3 y de otras muchas moléculas de adhesión <sup>(11, 29)</sup>.

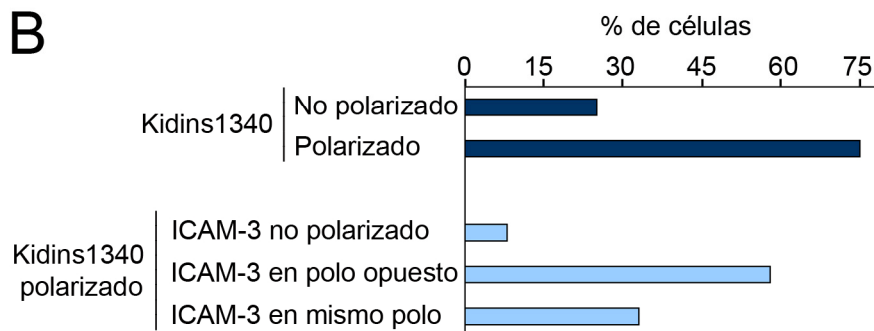
Con el fin de esclarecer la participación de Kidins220 en la adhesión intercelular en linfocitos T, generamos un Ac contra los residuos externos de nuestra molécula que denominamos anti-Tmb. Mediante WB de lisados totales de Peer y HSB2 con el anti-Tmb y utilizando el otro Ac generado contra el C-terminal de Kidins220 como control positivo pudimos comprobar que este segundo Ac reconocía la proteína específicamente (Fig. R11B).

A continuación, llevamos a cabo ensayos de agregación en la línea celular Peer. Para ello las células sembradas a alta concentración (2x10<sup>6</sup> céls/ml) fueron incubadas en presencia o ausencia del Ac anti-Tmb. Como podemos observar en los paneles centrales de la figura R11C, este último disminuye en buena medida la agregación basal de las células. Sin embargo, al estimular posteriormente las células con é.f como el PDBu, potentes activadores de la adhesión celular, el Ac anti-Tmb de Kidins220 potenciaba enormemente

**A**



**B**



**Figura R10. La sobre-expresión del dominio C-terminal de Kidins220 no altera la polaridad de las células Peer y se acumula mayoritariamente en el polo opuesto a ICAM-3**

**A**-Células Peer transfectadas con GFP-Kidins1340 fueron sembradas sobre cubres recubiertos con Fn (25µg/ml) y se sometieron a una doble inmunotinción con Ac anti-GFP y anti-ICAM-3 (rojo). Dos paneles con colores artificiales (paneles inferiores) han sido añadidos para destacar la distribución citoplasmática no homogénea de GFP-Kidins1340. Los asteriscos (\*) señalan los polos donde se acumula la proteína de fusión mientras que las cabezas de flecha (>) señalan aquellos donde se acumula ICAM-3. Barra de escala: 4 µm. **B**-Análisis cuantitativo del número de células Peer (n=100) en las que la distribución de GFP-Kidins1340 no está polarizada frente a las que presentan una distribución polarizada de dicha proteína (barras azul oscuro). Porcentaje de aquellas células que presentando GFP-Kidins1340 polarizado presentan a ICAM-3 en ese mismo polo, en el opuesto o no polarizado (barras azul celeste).

el efecto pro-agregatorio de estos compuestos (Fig. R11C paneles de la derecha).

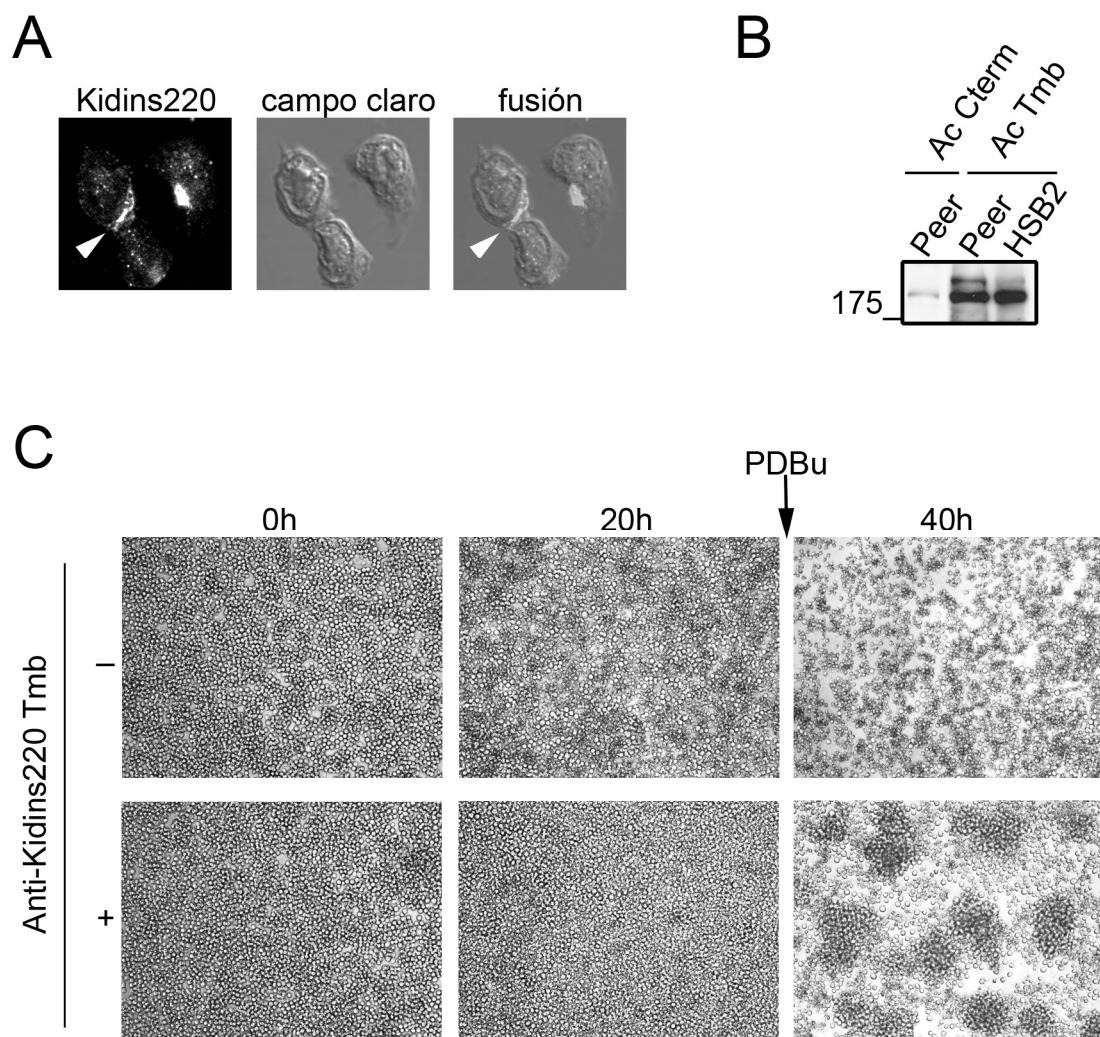
Aunque desconocemos los mecanismos que pone en marcha el Ac anti-Tmb, los resultados obtenidos derivados de su uso en ensayos de agregación en células Peer ponen de manifiesto la participación de

Kidins220 en los procesos de adhesión célula-célula en Linfocitos T.

### **R7- Kidins220 participa en la quimiotaxis en respuesta a SDF-1α**

Diversos trabajos aparecidos en los últimos años han discutido la posible implicación de mecanismos



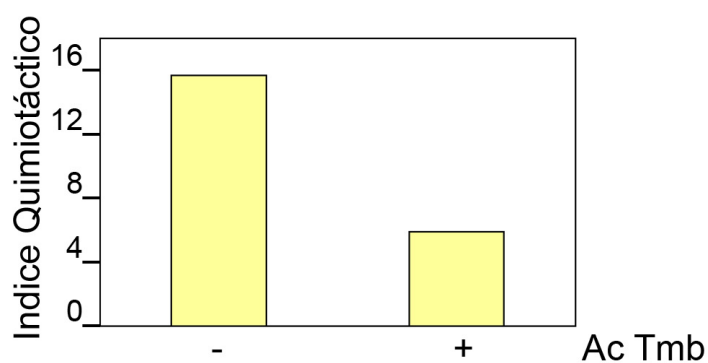


**Figura R11. Kidins220 participa en la adhesión célula-célula promovida por ésteres de forbol**

**A-** Inmunotinción de células Peer con anti-Kidins220 policlonal. La punta de flecha señala la presencia de Kidins220 en las zonas de interacción célula-célula. La fusión con el campo claro nos permite observar con nitidez esta acumulación de la proteína en zonas de contacto. **B-** Detección de la banda de Kidins220 en lisados totales de células Peer y HSB2 mediante WB con un nuevo Ac anti-Kidins220 que generamos en el laboratorio y que reconoce los residuos correspondientes a los lazos de la región transmembrana que se localizan en la región extracelular (Ac Tmb) como control positivo del tamaño de la banda utilizamos el Ac anti-Kidins220 policlonal (Ac Cterm) empleado en todas las inmunofluorescencias y WB mostrados anteriormente. **C-** Las células Peer fueron sembradas en placas de 96 pocillos a la densidad de  $2 \times 10^6$  céls/ml en ausencia (-) o presencia (+) del Ac anti-Kidins220 Tmb (dil. 1/20), y fueron posteriormente estimuladas a las 20h con PDBu (200nM). Se tomaron fotos con un objetivo 10X a distintos tiempos, mostrándose el aspecto de las células a 0h, 20h (previo a la estimulación con PDBu) y 40h del inicio del experimento.

moleculares conservados entre la migración direccional de las neuronas durante la formación del sistema nervioso en los estadios embrionarios y los procesos de quimiotaxis que regulan el tráfico y la migración de linfocitos en las respuestas inflamatorias en individuos adultos<sup>(212)</sup>.

Se ha demostrado la participación de Kidins220 en las vías de señalización de efrinas en neuronas y en uniones neuromusculares<sup>(132, 154)</sup>. Estas proteínas están implicadas en la guía axonal y la migración celular<sup>(130)</sup>. En los últimos años, se ha empezado a conocer la importancia de las efrinas en múltiples aspectos del desarrollo y función de los linfocitos T<sup>(302)</sup>. La



**Figura R12. Kidins220 regula la quimiotaxis en respuesta a SDF-1α en la línea celular Peer**

Las células Peer resuspendidas a  $5 \times 10^6$  céls/ml en RPMI con 0,1% de BSA fueron pretratadas (+) o no (-) durante 1h con una dilución 1/20 del Ac Tmb para la realización acto seguido de ensayos de migración en cámaras con poros o *transwells* en presencia o no de SDF-1α (10 ng/ml). La gráfica indica el efecto del pretratamiento con el Ac anti-Kidins220 en la quimiotaxis frente a SDF-1α representado como índice quimiotáctico (Ver materiales y métodos).

publicación reciente de dos trabajos que implican a estas últimas en la quimiotaxis mediada por SDF-1α en linfocitos T<sup>(1, 242)</sup>, nos hizo plantearnos la posible participación de Kidins220 en dicho proceso.

La quimiotaxis, es la capacidad de las células para responder a un determinado estímulo quimiotáctico. Dicha capacidad puede determinarse con el índice quimiotáctico, cociente que relaciona la migración en respuesta a un estímulo con la migración en su ausencia.

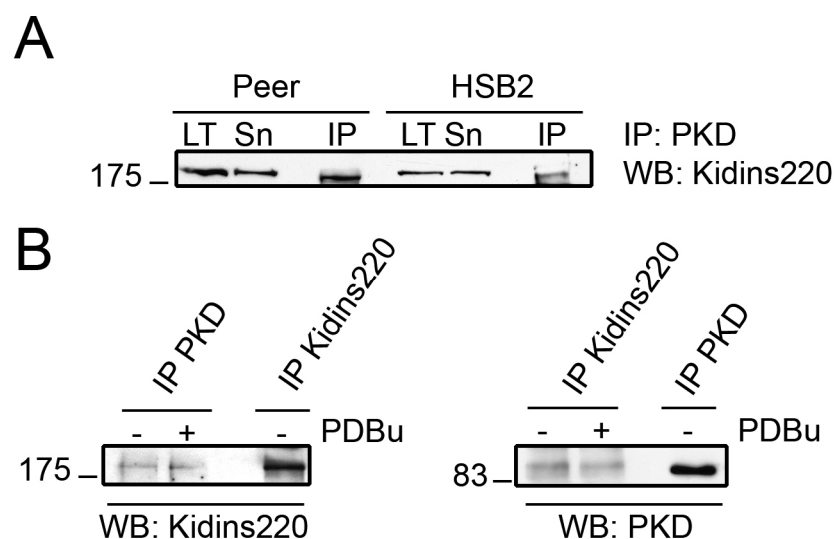
Para investigar la implicación de Kidins220 en la respuesta quimiotáctica a SDF-1α llevamos a cabo ensayos de migración de células Peer pre-tratadas o no durante 1h con el Ac anti-Tmb y sembradas en cámaras *transwell* en presencia o ausencia de SDF-1α. Como se observa en la figura R12, el pre-tratamiento de las células con el Ac provocaba una fuerte disminución de la quimiotaxis en respuesta a SDF-1α. Al igual que en el apartado R6, aunque desconocemos los mecanismos a través de los cuales el Ac anti-Tmb desencadena los efectos observados, los resultados obtenidos en los ensayos de migración nos indican la participación de Kidins220 en la respuesta quimiotáctica de las células Peer frente a SDF-1α.

## R8- PKD interacciona con Kidins220 en linfocitos T polarizados

Como ya hemos mencionado anteriormente Kidins220 fue clonado e identificado como el primer sustrato fisiológico conocido de PKD en células PC12<sup>(107)</sup>.

PKD se expresa de forma ubicua, si bien es particularmente abundante en linfocitos donde parece jugar un papel prominente. Prueba de ello es su demostrada activación en respuesta a la estimulación de los receptores de Ag tanto en células B<sup>(245)</sup> como en células T<sup>(173)</sup>.

Nuestro primer objetivo fue comprobar si, al igual que lo observado en la línea celular PC12<sup>(107)</sup>, PKD interaccionaba con Kidins220 en las líneas de células T constitutivamente polarizadas. Para ello llevamos a cabo inmunoprecipitaciones de PKD en lisados de Peer y HSB2, observándose claramente por WB la presencia de Kidins220 en los dos tipo celulares (Fig. R13A). Dado que los tratamientos con é.f como el PDBu provocan la activación y re-localización de PKD y -como hemos descrito anteriormente- dan lugar a una despolarización de Kidins220 en linfocitos, quisimos comprobar si dicha interacción se mantenía en presencia de PDBu. Para ello las células Peer sin estimular o estimuladas con PDBu fueron lisadas e



**Figura R13. PKD interacciona con Kidins220 en las líneas de linfocitos T Peer y HSB2**

**A-** Lisados celulares de las líneas Peer y HSB2 fueron inmunoprecipitados con anti-PKD, la presencia de Kidins220 fue comprobada por WB. LT (Lisados totales), Sn (Sobrenadante post-inmunoprecipitación) y IP (Inmunoprecipitados). **B-** Las células Peer fueron estimuladas (+) o no (-) con PDBu (200nM) durante 15min y los lisados celulares obtenidos fueron inmunoprecipitados con anti-PKD (panel izquierdo) o con anti-Kidins220 (panel derecho). La presencia respectiva de Kidins220 y PKD fue comprobada por WB. En ambos casos se corrió en paralelo una inmunoprecipitación de cada proteína como control positivo.

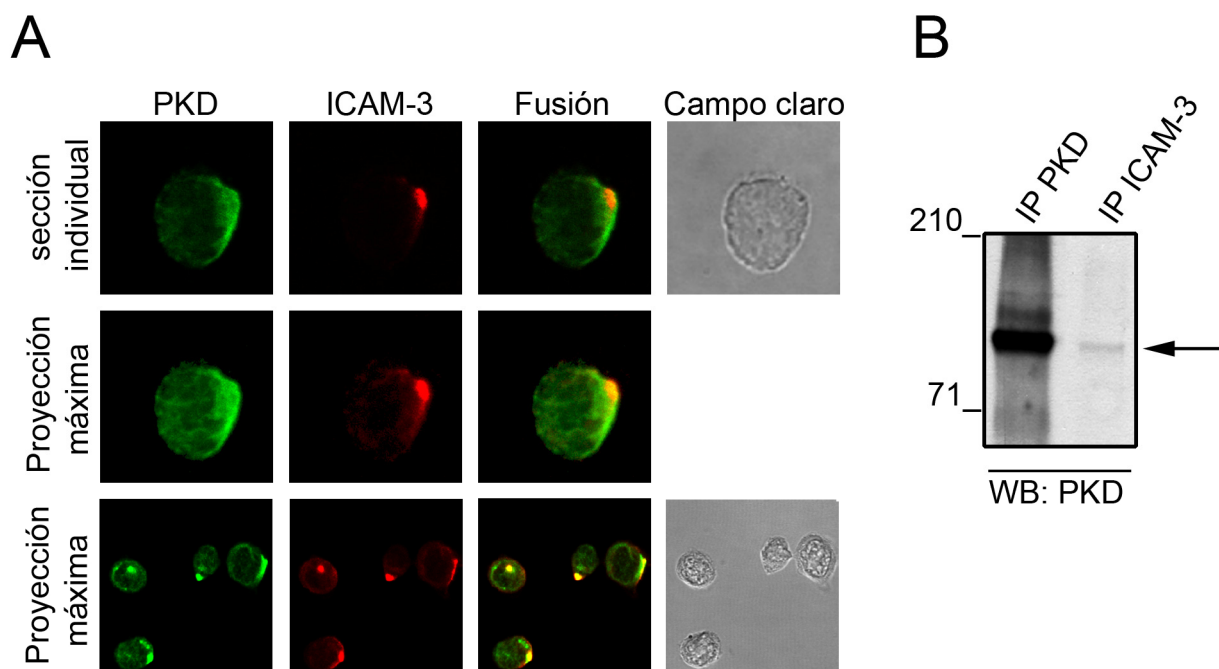
inmunoprecipitadas con Ac para PKD y para Kidins220. El análisis por WB de la presencia de Kidins220 en los inmunoprecipitados de PKD (Fig. R13B panel izquierdo) demuestra que la interacción entre estas dos proteínas se da tanto en ausencia como en presencia de PDBu. De forma equivalente, observamos PKD en los inmunoprecipitados de Kidins220 en ambos casos (Fig. R13B panel derecho).

### R9- PKD co-localiza e interacciona con ICAM-3

Hemos demostrado en figuras anteriores que Kidins220 presenta una distribución restringida encontrándose principalmente en el urópodo de los linfocitos T polarizados, co-localizando e interaccionando con ICAM-3. Al comprobar que PKD interaccionaba con Kidins220 en células T polarizadas, quisimos investigar si PKD también estaba presente en el urópodo y si co-localizaba e interaccionaba con ICAM-3.

Analizando inmunofluorescencias dobles en células Peer con Ac contra PKD y contra ICAM-3 por microscopía confocal pudimos comprobar que ambas proteínas co-localizan parcialmente. Como se observa en la figura R14A, PKD también se encuentra polarizado, si bien su distribución no se reduce a un área tan restringida como ICAM-3. A su vez, analizamos por WB la presencia de PKD en inmunoprecipitados de ICAM-3 en células Peer, detectando una banda que corresponde al enzima, demostrando de esta manera la interacción entre ICAM-3 y PKD (Fig. R14B). Al igual que en el caso de ICAM-3 con Kidins220, no pudimos detectar ICAM-3 en los inmunoprecipitados de PKD dado que los Ac contra esta molécula de adhesión no funcionan en ensayos de WB.

En su conjunto, los datos obtenidos por inmunofluorescencia y WB sugieren que una fracción de PKD está interaccionando con ICAM-3 en células Peer.



**Figura R14. PKD colocaliza parcialmente e interacciona con ICAM-3**

**A-** Las células Peer fueron sembradas sobre cubreobjetos recubiertos con Fn (25µg/ml) y teñidas con anti-PKD (verde) y anti-ICAM-3 (rojo). Las imágenes de microscopía confocal presentadas corresponden a una sección individual a 0,8 µm del sustrato (paneles superiores), y a la proyección máxima de una serie completa de secciones tomadas cada 0,4 µm de 0 a 2 µm del sustrato (paneles inferiores). **B-** Las células Peer fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anti-PKD (control positivo) o con anti- ICAM-3 y la presencia de PKD en los inmunoprecipitados fue comprobada por WB. Una flecha negra señala la banda correspondiente a PKD.

A continuación realizamos ensayos IVK para demostrar por otros métodos la interacción entre ICAM-3 y PKD. Para ello inmunoprecipitamos tanto ICAM-3 como PKD de lisados de células Peer y llevamos a cabo ensayos IVK. PKD tiene la propiedad de seguir activa tras la inmunoprecipitación, siendo por lo tanto capaz de autofosforilarse y de fosforilar a otras proteínas *in vitro*. Mediante autorradiografía de las muestras resueltas en geles grandes SDS-PAGE, este tipo de ensayos permite detectar la banda de PKD autofosforilada, así como otras bandas correspondientes a posibles sustratos u otras quinasas presentes en los inmunoprecipitados.

La figura R15A muestra la banda de autofosforilación de PKD en los inmunoprecipitados de la quinasa, así como un doblete cuya banda inferior coincidía con el peso molecular del enzima en los inmunoprecipitados de ICAM-3. Con el fin de determinar si dicha banda

era PKD, procedimos a analizar las muestras del ensayo IVK por WB. Para ello, transferimos a membranas de nitrocelulosa mini-geles de SDS-PAGE en los que habíamos resuelto dichas muestras. Expusimos los filtros para obtener una autorradiografía, y posteriormente los incubamos con el Ac para PKD-Pser916. La presencia de un doblete cuya señal solapaba exactamente con la detectada en la autorradiografía (Fig. R15B) demuestra claramente que ICAM-3 interacciona con moléculas de PKD activas capaces de autofosforilarse.

### **R10- La interacción de ICAM-3 con la fracción fosforilada/activa de PKD depende de las vías de PKC**

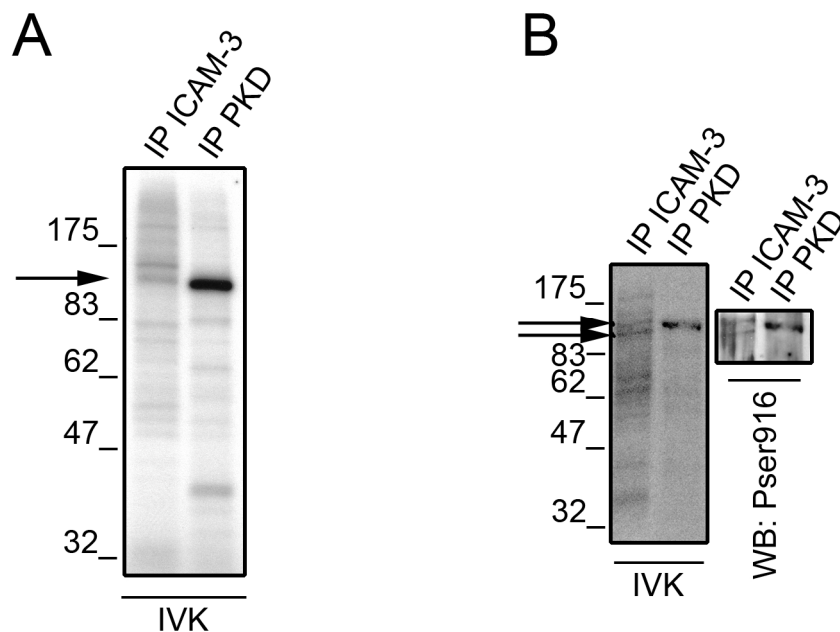
Es un hecho ya establecido que la activación de PKD en respuesta a é.f, así como a otros muchos estímulos fisiológicos, está mediada por su fosforilación por parte



de las PKCs en las Ser744 y Ser748 presentes en el lazo de activación.<sup>(110, 295, 297)</sup>. Una vez activa, PKD es capaz de auto-fosforilarse en varios residuos, siendo uno de ellos la Ser916 del extremo C-terminal. El Ac que reconoce específicamente dicha serina fosforilada (anti-Pser916, utilizado en el apartado anterior Fig. R15B) ha sido empleado en numerosos estudios para detectar la proteína activa<sup>(172)</sup>. De modo que está bastante aceptado que la fosforilación de la Ser916 es una medida de la actividad enzimática. A su vez, la activación de PKD lleva asociada cambios en su localización intracelular. Este fenómeno ampliamente descrito en múltiples tipos celulares, incluyendo linfocitos<sup>(28, 166, 215-220)</sup>, hace suponer que cambios en el estado de activación del enzima conlleven a cambios en las interacciones con otras proteínas.

Teniendo en cuenta además que el uso de é.f provoca la despolarización de ICAM-3 y Kidins220 en las líneas de linfocitos que estamos estudiando, y que la redistribución de ambas moléculas depende de las vías de señalización de PKCs, nos propusimos estudiar los cambios de interacción de PKD con ICAM-3 ligados a su activación por é.f.

Como hemos explicado anteriormente (ver apartado M9 de materiales y métodos) con los Ac de PKD disponibles nos era imposible determinar mediante WB cambios de interacción entre PKD e ICAM-3 ligados a la estimulación con é.f. Por ello, y basándonos en la capacidad de PKD para autofosforilarse *in vitro* recurrimos a los ensayos IVK para evaluar dichos cambios. Así, se prepararon lisados de células Peer, estimuladas o no con PDBu, que fueron



**Figura R15. Detección de la interacción entre ICAM-3 y PKD mediante ensayos IVK en inmunoprecipitados de ICAM-3**

**A-** Lisados de células Peer fueron inmunoprecipitados con anti-ICAM-3 o con anti-PKD durante 2h para realizar posteriormente un ensayo IVK con 100μM de ATP total y trazas de [ $\gamma^{32}$ P] ATP. Las muestras fueron resueltas por SDS-PAGE en geles grandes que fueron secados y auto-radiografiados para detectar las bandas fosforiladas. La flecha negra señala la banda que corresponde con el tamaño de PKD. **B-** Lisados de células Peer fueron inmunoprecipitados con anti-ICAM-3 o con anti-PKD. Tras el ensayo IVK, las muestras de ambos inmunoprecipitados fueron separadas en mini-geles SDS-PAGE para posteriormente transferir las muestras a papel de nitrocelulosa y, tras la correspondiente autorradiografía (IVK), realizar la detección de PKD fosforilado/activo mediante WB con anti-Pser916 (panel derecho). Nótese que el doblete observado en la autorradiografía de los inmunoprecipitados de ICAM-3 y señalado con dos flechas corresponde a PKD-Pser916.

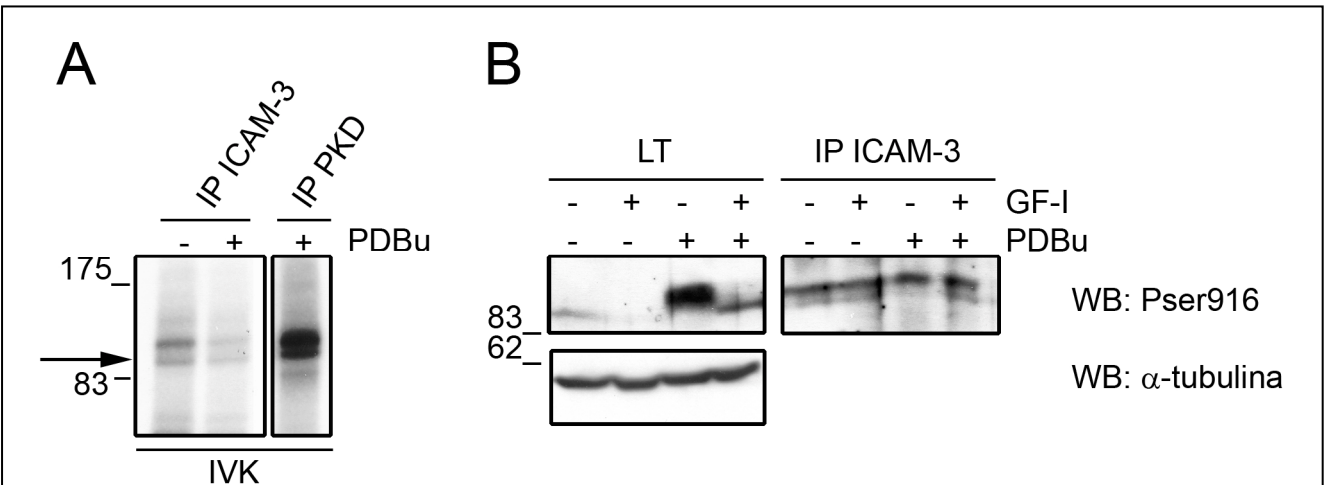
inmunoprecipitados con anti-ICAM-3 y sometidos posteriormente a un ensayo IVK. Las muestras se resolvieron en geles SDS-PAGE de gran tamaño, que fueron secados y expuestos. En la autorradiografía encontramos el mismo doblete radiactivo que el mostrado en la figura anterior cuya intensidad disminuía en los inmunoprecipitados de ICAM-3 procedentes de células tratadas con PDBu (Fig. R16A). Estos resultados muestran que el tratamiento con é.f atenúa la interacción de ICAM-3 con PKD.

A continuación investigamos si la fracción fosforilada/activa de PKD interaccionaba con ICAM-3 y si los tratamientos con é.f también disociaban esta interacción. Adicionalmente, quisimos analizar si los efectos provocados por el PDBu eran dependientes de vías de señalización de PKC. Para ello las células Peer fueron pre-tratadas o no con el inhibidor de PKCs, GF-I, y posteriormente estimuladas o no con PDBu. Una vez inmunoprecipitado ICAM-3 de los lisados se

analizó la presencia de PKD fosforilada/activa por WB con el Ac fosfoespecífico anti-Pser916. En los inmunoprecipitados de ICAM-3, se detectó un doblete correspondiente a la fracción fosforilada/activa de PKD incluso en células sin estimular, demostrando que existe una fracción de PKD fosforilada/activa que interacciona de forma constitutiva con ICAM-3 (Fig. R16B). Al estimular con PDBu se pierde casi por completo la banda inferior del doblete, una variación que es prevenida al pretratar las células con GF-I.

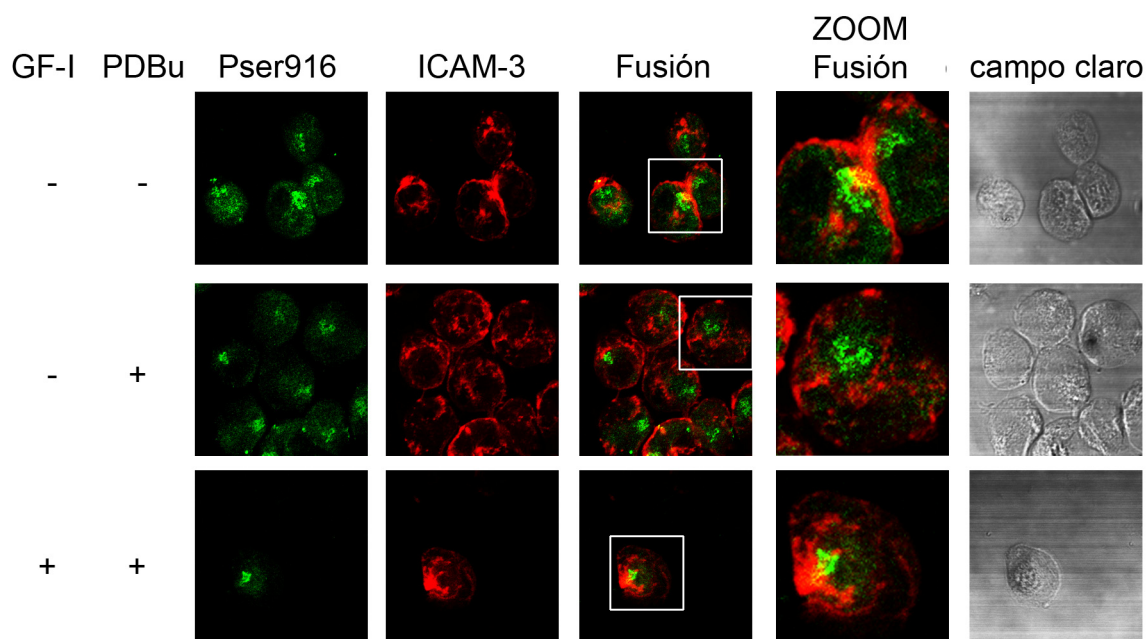
Además, hemos de tener en cuenta que la cantidad de PKD fosforilada en la Ser916 en los lisados totales de células estimuladas con PDBu es muy superior a la encontrada en células sin tratar. Este hecho refuerza todavía más el que de algún modo la PKD fosforilada/activa interaccione menos con ICAM-3.

Así la disminución en la interacción entre ICAM-3 y PKD al estimular las células con PDBu observada en los ensayos IVK (Fig. R16A) correlaciona a su vez con



**Figura R16. PDBu regula la interacción entre ICAM-3 y PKD. Implicación de las vías de PKC**

**A-** Lisados de células Peer estimuladas (+) o no (-) con PDBu (200nM) fueron inmunoprecipitados con anti-ICAM-3 durante 2h para realizar posteriormente un ensayo IVK con 100μM de ATP total y trazas de [ $\gamma^{32}$ P] ATP. Las muestras fueron resueltas por SDS-PAGE en geles grandes que fueron secados y auto-radiografiados para detectar las bandas fosforiladas. Un inmunoprecipitado de PKD de lisados de células Peer estimuladas con PDBu (+) fue corrido en paralelo como control positivo. La flecha señala la banda que corresponde con el tamaño de PKD. **B-** Para investigar la implicación de las vías de PKC en la interacción de la fracción fosforilada de PKD con ICAM-3, las células Peer preincubadas (+) o no (-) durante 1h con GF-I (3,5μM) fueron estimuladas (+) o no (-) con PDBu 200nM durante 15min. Los lisados fueron inmunoprecipitados con anti-ICAM-3 y la presencia de PKD en dichos inmunoprecipitados fue analizada por WB con anti-Pser916. Las muestras fueron resueltas en geles de gran tamaño para separar bien el doblete de PKD. Un WB con anti-α-tubulina se realizó como control de carga.



**Figura R17. La co-localización parcial de PKD-Pser916 con ICAM-3 depende de las vías de PKC**

Células Peer sembradas sobre cubreobjetos recubiertos con Fn (25µg/ml) fueron preincubadas (+) o no (-) durante 1h con GFI (3,5µM) y posteriormente estimuladas (+) o no (-) durante 15min con PDBu (200nM). Tras fijarse fueron teñidas con anti-Pser916 (verde) y anti-ICAM-3 (rojo). Las imágenes de microscopía confocal presentadas corresponden a la proyección máxima de una serie completa de secciones. Para observar con mayor detalle la co-localización parcial de ambas proteínas se presentan imágenes con un ZOOM de 2,5x (panel derecho).

una menor interacción de la fracción fosforilada/activa de la quinasa con la molécula de adhesión (Fig. R16B). En su conjunto, estos resultados muestran que las vías de señalización de PKC modulan la interacción de PKD con ICAM-3.

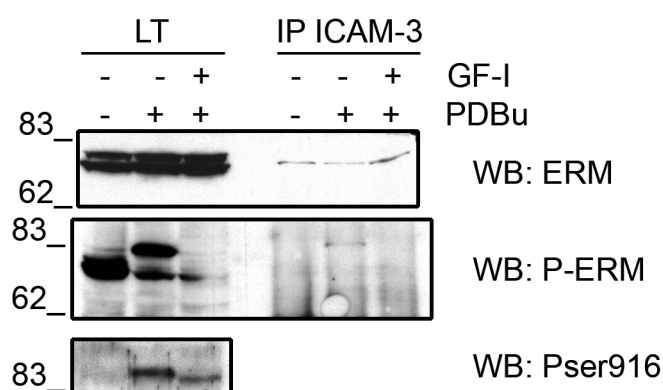
Acto seguido, analizamos la distribución de ICAM-3 y la fracción fosforilada/activa de PKD en células Peer, así como el grado de co-localización de ambas proteínas en respuesta a PDBu, y al pre-tratamiento con el inhibidor de PKCs, GF-I. Para ello, se realizaron inmunotinciones dobles para ICAM-3 y PKD-Pser916 que fueron analizadas por microscopía confocal (Fig. R17). En condiciones basales, PKD fosforilada se concentraba mayoritariamente en una región muy puntual, circundante a ICAM-3, co-localizando en parte con esta. La localización de esta fracción fosforilada/activa de PKD no parece sufrir cambios al estimularse la vía de PKC con é.f, mientras que ICAM-3 pierde la polaridad y se redistribuye por toda la

membrana, perdiéndose por completo la co-localización parcial de ambas proteínas tras la estimulación con PDBu (Fig. R17 paneles centrales). Como ya hemos mostrado anteriormente (Fig. R9) el pre-tratamiento con GF-I previene la despolarización de ICAM-3, conservándose el solapamiento parcial de ambas proteínas (Fig. R17 paneles inferiores).

Estos resultados apoyan los datos de la figura anterior (Fig. R16) que indicaban que una fracción de PKD fosforilada en la Ser916 interacciona con ICAM-3 de forma basal y que esta asociación está de algún modo regulada por las vías de señalización de PKC.

### R11- Las vías de señalización de PKC regulan la interacción de ICAM-3 con las proteínas ERM fosforiladas

La familia de proteínas ERM juega un papel fundamental como enlace entre las proteínas integrales de membrana y el CK de actina, siendo esenciales en la



**Figura R18. Efecto de las vías de PKC sobre la interacción ICAM-3 con la familia de proteínas ERM.**

Células Peer pretratadas (+) o no (-) durante 1h con GFI (3,5 $\mu$ M) y posteriormente estimuladas (+) o no (-) durante 15min con PDBu (200nM) fueron lisadas y inmunoprecipitadas con anti-ICAM-3. La presencia de las proteínas ERM así como de fosfo-ERM (P-ERM) en los lisados totales y los inmunoprecipitados fue analizada mediante WB. La presencia de PKD-Pser916 en los lisados totales se utilizó como control positivo de la activación o inhibición de las vías de PKC por PDBu y GF-I, respectivamente.

redistribución de las distintas moléculas de adhesión presentes en el urópodo de los linfocitos T<sup>(35, 237, 238)</sup>. La fosforilación en una treonina del C-terminal de las proteínas ERM previene la interacción de dicho dominio con el dominio FERM N-terminal, estabilizando su conformación abierta activa<sup>(76, 103, 248)</sup>. Dicha fosforilación es por tanto considerada como una marca de la activación de las proteínas ERM. No queda claro, sin embargo, el papel jugado por las proteínas ERM fosforiladas en la polarización de los linfocitos T. Así mientras algunos autores señalan la importancia de las proteínas ERM fosforiladas en el establecimiento de la distribución polarizada de proteínas de membrana y la posterior formación de la estructura del urópodo<sup>(141)</sup>, otros autores, por el contrario, han asociado la rápida defosforilación de las ERM a la polarización inducida por quimioquinas en linfocitos T de sangre periférica, señalando un papel negativo de las proteínas ERM fosforiladas en el proceso de polarización de las células T<sup>(24)</sup>.

Sabiendo que la activación de las vías de PKC, activa a PKD y promueve a su vez, como hemos visto, la redistribución de ICAM-3 en células T polarizadas, y teniendo en cuenta la importancia que las proteínas ERM juegan en los procesos de re-localización de ICAM-3, quisimos determinar cómo afectaban la

activación o inhibición de las vías de PKC en la interacción entre ICAM-3 y las proteínas ERM.

Para ello inmunoprecipitamos ICAM-3 de lisados de células Peer sin estimular o estimuladas con PDBu, pre-tratadas o no a su vez con GF-I. Los tratamientos con PDBu provocaron un dramático cambio de movilidad de las proteínas ERM fosforiladas, por el contrario el pre-tratamiento con GF-I bloqueaba este fenómeno al igual que disminuía su fosforilación basal (Fig. R18, panel central). Los tratamientos no afectaban a la señal obtenida con el Ac que detecta proteínas ERM totales, ni alteraba en gran medida la cantidad de las mismas que interaccionaban con ICAM-3 (Fig. R18, panel superior). Más significativa es la presencia de la banda de menor movilidad electroforética detectada con el Ac anti-P-ERM en los inmunoprecipitados de ICAM-3 de células estimuladas con PDBu y que está ausente en células sin tratar o pre-incubadas con GF-I (Fig. R18 panel central, parte derecha).

Parece entonces que en las células Peer, la despolarización de ICAM-3 en respuesta a é.f se correlaciona con una interacción de dicha molécula de adhesión con una fracción fosforilada distinta, de nueva movilidad electroforética, de las proteínas ERM de modo dependiente de las vías de PKC.

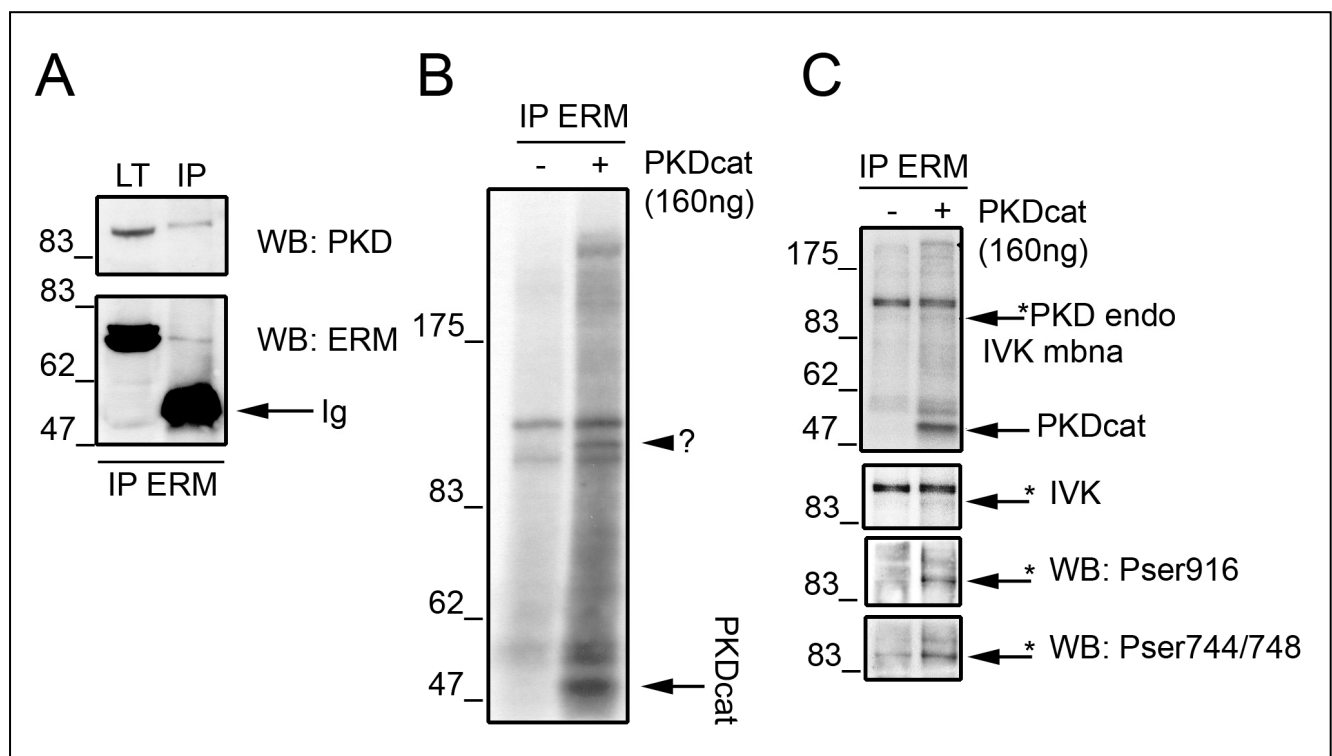
A su vez, este cambio en la movilidad electroforética de las proteínas ERM bien podría ser debido a un cambio en el estado de fosforilación de dichas proteínas promovido por las vías de señalización de PKC.

### R12- PKD interacciona con las proteínas ERM pero no participa en su fosforilación

Varias quinasas han sido implicadas en la regulación de las proteínas ERM mediante fosforilación de su dominio C-terminal. Distintos estudios han determinado la capacidad de PKC $\alpha$ , PKC $\theta$  y ROCK, de fosforilar *in vitro* a las proteínas ERM<sup>(164, 191, 208)</sup>. Sin embargo, el papel de estas quinasas en la fosforilación

*in vivo* de las proteínas ERM sigue siendo una incógnita. Teniendo en cuenta que PKD ha sido descrita como un efector de las tres quinasas mencionadas anteriormente<sup>(144, 307)</sup> decidimos estudiar si PKD era capaz de fosforilar a las proteínas ERM *in vitro*.

En primer lugar, comprobamos si estas dos proteínas interaccionan entre si. Para ello se prepararon inmunoprecipitados de proteínas ERM provenientes de lisados de células Peer y se analizó la presencia de PKD por WB. Los resultados obtenidos muestran claramente que PKD y las proteínas ERM interaccionan en esta línea de linfocitos T constitutivamente polarizados (Fig. R19A).



**Figura R19. PKD interacciona con las proteínas ERM pero no participa en su fosforilación**

**A-** Para estudiar la posible interacción de PKD con la familia de proteínas ERM se prepararon inmunoprecipitados de ERM de lisados de células Peer y la presencia de PKD en dichos inmunoprecipitados fue analizada por WB. Una flecha señala la banda correspondiente a la cadena pesada de la Ig. **B-** Con la intención de determinar si las proteínas ERM eran sustrato de PKD se inmunoprecipitaron proteínas ERM de células Peer para llevar a cabo ensayos IVK con [ $\gamma^{32}$ P] ATP en presencia (+) u ausencia (-) de una proteína de fusión conteniendo el fragmento catalítico activo de PKD (PKDcat, señalado con una flecha), no apreciándose ninguna banda de fosforilación a la altura de las proteínas ERM (entre 70 y 80kDa) **C-** Para determinar si la banda presente en la autorradiografía observada únicamente en presencia de PKDcat (carril+, punta de flecha con interrogación) correspondía a PKD endógeno, las muestras del ensayo IVK descrito en el apartado B fueron separadas en minigeles y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Tras la correspondiente autorradiografía del filtro (panel superior: IVK mbna) la presencia de PKD-Pser916 y de PKD-Pser744/748 fue analizada por WB. La flecha con asterisco marca la banda de PKD endógena fosforilada (\*PKDendo).



A continuación y para estudiar la posibilidad de que las proteínas ERM fueran sustrato de PKD, procedimos nuevamente a preparar inmunoprecipitados de ERM que fueron sometidos a un ensayo IVK en ausencia o en presencia de una proteína de fusión conteniendo el fragmento catalítico activo de PKD fusionado a GST (GST-PKDcat).

Aunque se observan distintas bandas fosforiladas en la autorradiografía, no aparece ninguna a la altura del peso molecular de las proteínas ERM (Fig. R19B). Este resultado nos indica que PKD es incapaz de fosforilar *in vitro* a las ERM en estas condiciones experimentales.

La presencia, sin embargo, de una banda a la altura presumible de PKD (Fig. R19B, punta de flecha con interrogante) nos llevo a estudiar la identidad de dicha banda. Para ello, las muestras del ensayo IVK fueron resueltas en mini-geles de SDS-PAGE y transferidas a filtros de nitrocelulosa. Tras autorradiografiar la membrana, realizamos un WB con anti-Pser916 para detectar la posible presencia de la banda fosforilada de PKD (Fig. R19C).

Al añadir el fragmento catalítico constitutivamente activo de PKD observamos una banda fosforilada en la autorradiografía procedente de la IVK que se solapa totalmente con la banda obtenida utilizando tanto el Ac Pser916 como otro Ac que reconoce los residuos fosforilados por PKC en el lazo de activación de PKD (Ac anti-Pser744/748).

Como hemos comentado anteriormente PKD activa tiene la capacidad de autofosforilarse *in vitro*, en este caso la proteína PKD endógena presente en los inmunoprecipitados de las proteínas ERM es incapaz de autofosforilarse, siendo fosforilada únicamente en presencia de GST-PKDcat. Esto se debe a que distintas moléculas de PKD se pueden trans-fosforilar como hemos descrito recientemente<sup>(233)</sup>.

Este resultado nos ha permitido demostrar que la fracción de PKD endógena que se encuentra interaccionando con las proteínas ERM en linfocitos T polarizados es mayoritariamente una proteína inactiva/no fosforilada.

## **R13- ICAM-3 es sustrato *in vitro* de PKD**

### **R13.1- PKD fosforila el dominio citoplásmico de ICAM-3**

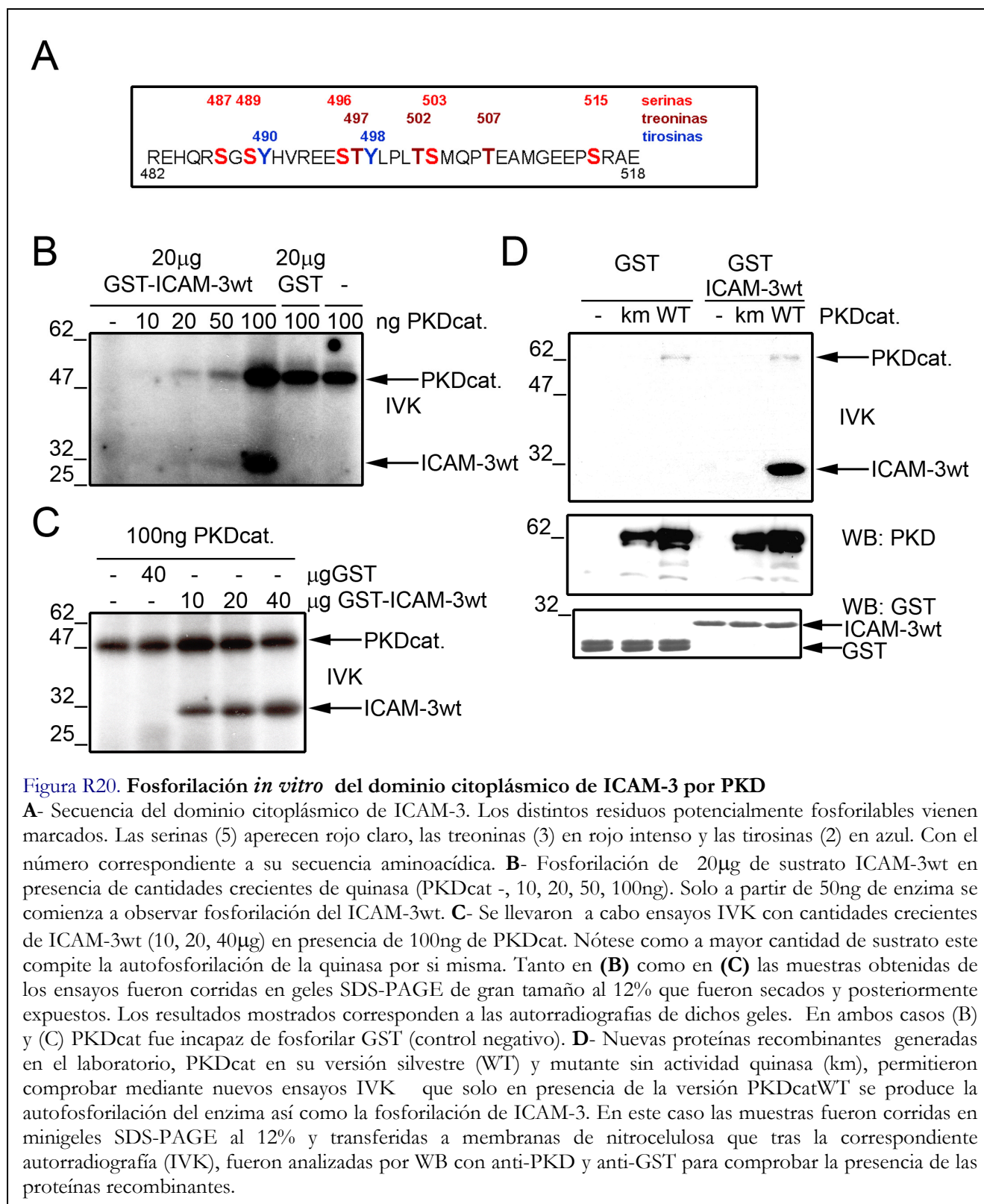
Hace ya bastante tiempo que el Dr. Joel Hayflick estableció la importancia de las diversas serinas presentes en la cola citoplasmática de ICAM-3 en procesos tales como la co-estimulación del receptor de Ag de las células T, la agregación homotípica de dichas células, así como la extensión celular sobre sustratos o *cell spreading*<sup>(98)</sup>. En dicha publicación también mapeó la Ser489 como sitio de fosforilación *in vivo* en respuesta a é.f, así como la fosforilación *in vitro* por PKC $\theta$  de dicho residuo. Posteriormente, el grupo del Dr. Francisco Sánchez-Madrid estableció la importancia de varias de las serinas de dicha región citoplasmática de ICAM-3 en el establecimiento de la interacción con las proteínas ERM y su consiguiente redistribución al urópodo de los linfocitos motiles mediada por estas últimas<sup>(240)</sup>. Vista la importancia de las fosforilaciones de los residuos citoplasmáticos de ICAM-3, y más en particular de las serinas presentes en dicha región, y teniendo en cuenta que PKD es un efector de PKC $\theta$ <sup>(307)</sup>, que interacciona a su vez con ICAM-3 y con las ERM, decidimos estudiar si PKD era capaz de fosforilar el dominio citoplásmico de ICAM-3.

Como se muestra en la figura R20A, el dominio citoplásmico de ICAM-3 consta de 37 residuos. Su corta cola citoplásmica presenta cinco serinas, cuatro treoninas y dos tirosinas, siendo por tanto potencialmente fosforilable por distintas quinasas. Para determinar si PKD era capaz de fosforilar dicho dominio citoplásmico generamos una proteína con el dominio citoplásmico de ICAM-3 fusionado al C-terminal de la GST (GST-ICAM-3wt) y llevamos a cabo ensayos IVK.

Los ensayos IVK en presencia de cantidades crecientes de GST-PKDcat, demostraron que dicho fragmento catalítico es capaz de fosforilar la proteína de fusión GST-ICAM-3wt, no fosforilando la proteína control GST (Fig. R20B). Además comprobamos que la

fosforilación de ICAM-3 depende de la cantidad de quinasa presente en los ensayos de IVK, así cantidades de enzima inferiores a 50ng no son capaces de fosforilar dicho fragmento de ICAM-3 (Fig. R20B).

También pudimos comprobar que cantidades crecientes de sustrato se correlacionan con una mayor fosforilación de este por la quinasa llegando incluso a competir este sustrato con la auto/transfosforilación



del enzima (Fig. R20C carriles de 20 y 40µg de GST-ICAM-3wt).

Decidimos realizar un análisis más detallado de la fosforilación de ICAM-3 por PKD, mediante ensayos IVK llevados a cabo con proteínas de fusión conteniendo el dominio catalítico activo (GST-PKD1cat-WT) o inactivo de PKD (GST-PKD1cat-km). La autorradiografía mostró que solo la GST-PKDcat-WT es capaz de auto-fosforilarse y de fosforilar el dominio citoplásmico de ICAM-3 (Fig. R20D).

### R13.2-Mapeo del sitio de fosforilación por PKD

Tras quedar demostrado que ICAM-3 es un sustrato *in vitro* de PKD, nos propusimos analizar qué residuo o residuos de la región citoplasmática de ICAM-3 es o son fosforilados por el enzima. Para ello realizamos nuevos ensayos IVK en presencia de GFP-PKDcat-WT utilizando tanto GST-ICAM-3wt como distintos mutantes puntuales a alanina en las Ser487, Ser489, Ser496, Ser503 y Thr497 (Fig. R21A. Mutantes S487A, S489A, S496A, S503A y T497A.).

El resultado de la autorradiografía (Fig. R21B) nos muestra claramente que ninguno de los mutantes puntuales era capaz de bloquear completamente la fosforilación por PKD, aunque casi todos ellos reducen considerablemente el grado de fosforilación del dominio citoplásmico de ICAM-3 por PKD, salvo el mutante S487A, que sufre un notable aumento de la fosforilación.

Este hecho señala la más que probable presencia de más de un residuo fosforilable por PKD en el dominio citoplásmico de ICAM-3. Es particularmente significativa la bajada en los niveles de fosforilación que se detecta con los mutantes puntuales S489A y S496A (Fig. R21B). Casualmente ambos mutantes presentan una arginina en posición -3 desde la serina, un residuo conservado de la secuencia consenso de fosforilación de sustratos de PKD (Fig. R21C).

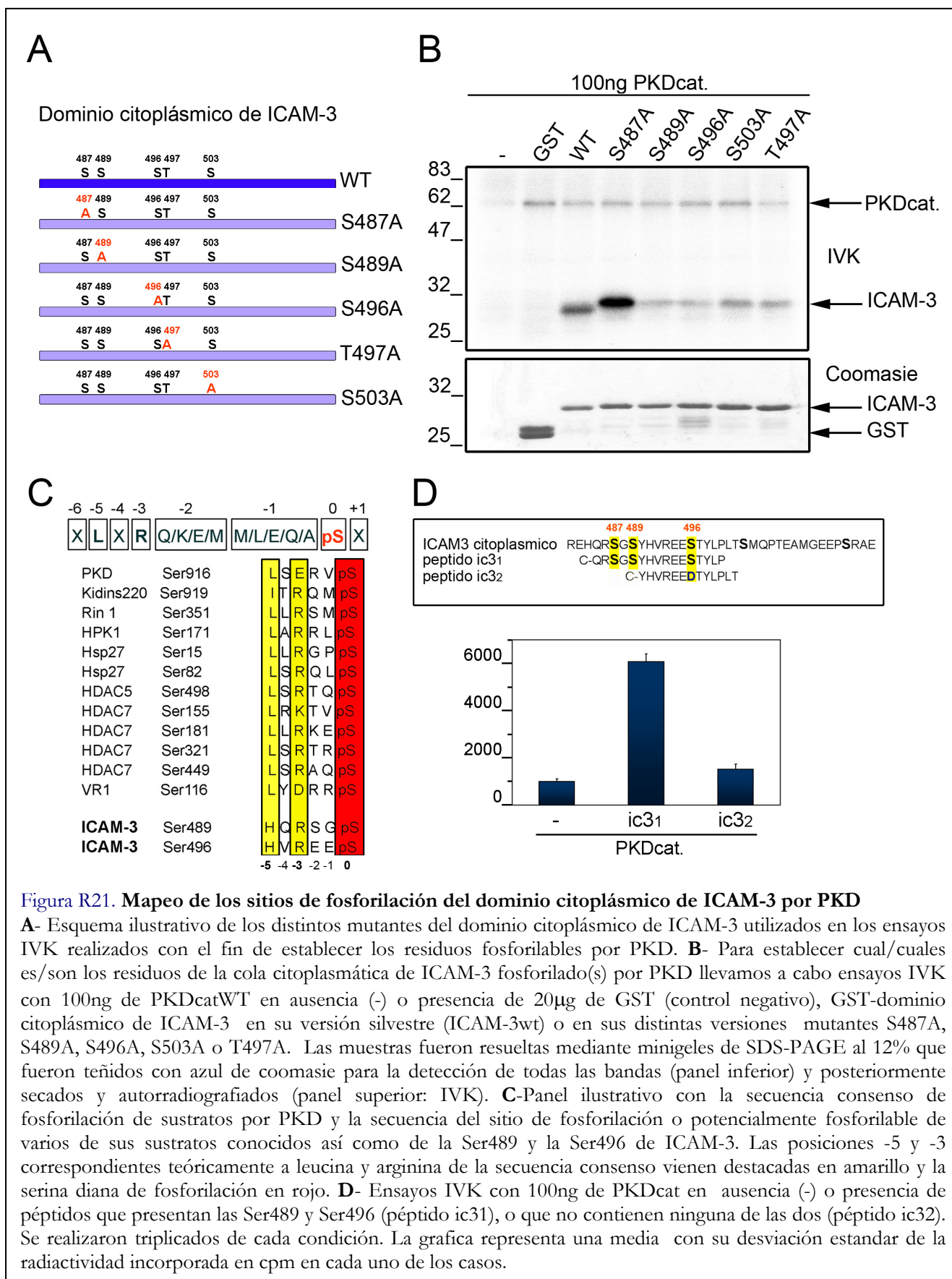
Más concretamente la Ser496 respeta las posiciones -1 a -4 de la secuencia consenso establecida para los

distintos sustratos de PKD, pero presenta una histidina en posición -5 en vez de la leucina reconocida como mayoritaria en esta secuencia consenso. Tampoco la Ser489 presenta esta leucina en posición -5 (Fig. R21C). Sin embargo, dicha secuencia consenso no es respetada en todos los distintos sustratos de PKD. Valga como ejemplo la misma Ser916 de la cola C-terminal de PKD, residuo auto/transfosforilado por dicha quinasa, que no presenta la arginina ni ningún residuo básico en posición -3 sino en la posición -2. De idéntica forma la Ser496 de ICAM-3 presenta una valina en posición -4 un aminoácido alifático que bien podría hacer la función de la leucina -5 de la secuencia consenso.

Para estudiar más en profundidad la fosforilación del dominio citoplásmico de ICAM-3 por PKD, y más concretamente la posible fosforilación de la Ser496 por dicha quinasa, estudiamos la fosforilación de los péptidos ic31 y ic32 por el fragmento catalítico puro de PKD (Fig. R21D). El péptido ic31 contiene los residuos 485 a 501 del dominio citoplásmico de ICAM-3 región con tres serinas, la Ser487 que no es sustrato de PKD (ver Fig. R21B), así como la Ser489 y la Ser496. El péptido ic32 que contiene los residuos 490 a 502 y tiene mutada la Ser496 por un glutámico. Ambos péptidos presentan la Thr497 (Fig. R21D).

La fosforilación por parte de PKD del péptido ic31 y la falta de fosforilación del péptido ic32 (en el que la Ser496 aparece mutada) sugiere nuevamente que esta serina es sustrato de PKD (Fig. R21D). La ausencia de fosforilación por PKD del péptido ic32 que contiene la Thr497, deja claro por otro lado que la Thr497 no es sustrato de PKD al menos en este tipo de ensayos de fosforilación de péptidos *in vitro* y sugiere que la baja fosforilación del mutante T497A por la quinasa observada en los ensayos IVK (Fig. R21B) puede ser consecuencia de alteraciones conformacionales producidas en la estructura del dominio citoplasmático de ICAM-3 que afecten a la fosforilación de otros residuos cercanos en estos ensayos de fosforilación de proteínas mutantes *in vitro*.





**Figura R21. Mapeo de los sitios de fosforilación del dominio citoplásmico de ICAM-3 por PKD**

**A-** Esquema ilustrativo de los distintos mutantes del dominio citoplásmico de ICAM-3 utilizados en los ensayos IVK realizados con el fin de establecer los residuos fosforilables por PKD. **B-** Para establecer cual/cuales es/son los residuos de la cola citoplasmática de ICAM-3 fosforilado(s) por PKD llevamos a cabo ensayos IVK con 100ng de PKDcatWT en ausencia (-) o presencia de 20µg de GST (control negativo), GST-dominio citoplásmico de ICAM-3 en su versión silvestre (ICAM-3wt) o en sus distintas versiones mutantes S487A, S489A, S496A, S503A o T497A. Las muestras fueron resueltas mediante minigeles de SDS-PAGE al 12% que fueron teñidos con azul de coomasie para la detección de todas las bandas (panel inferior) y posteriormente secados y autorradiografiados (panel superior: IVK). **C-** Panel ilustrativo con la secuencia consenso de fosforilación de sustratos por PKD y la secuencia del sitio de fosforilación o potencialmente fosforilable de varios de sus sustratos conocidos así como de la Ser489 y la Ser496 de ICAM-3. Las posiciones -5 y -3 correspondientes teóricamente a leucina y arginina de la secuencia consenso vienen destacadas en amarillo y la serina diana de fosforilación en rojo. **D-** Ensayos IVK con 100ng de PKDcat en ausencia (-) o presencia de péptidos que presentan las Ser489 y Ser496 (péptido ic31), o que no contienen ninguna de las dos (péptido ic32). Se realizaron triplicados de cada condición. La grafica representa una media con su desviación estandar de la radiactividad incorporada en cpm en cada uno de los casos.

## R14- Estudio funcional de PKD en la línea de linfocitos T polarizados Peer

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar el posible papel de PKD en diversos procesos clave de la biología del

linfocito T, como son la adhesión a sustrato, la interacción homotípica entre células T y la migración en ausencia o presencia de estímulos quimioatrayentes. Para ello llevamos a cabo distintos ensayos funcionales sobre-expresando en la línea de linfocitos T constitutivamente polarizados Peer las construcciones GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca (constitutivamente activa) y GFP-PKD1km (“kinasa muerto”) (Fig. R22A, ver materiales y métodos para detalles de los mutantes).

#### **R14.1- Distribución celular de los distintos mutantes de PKD1 en células Peer**

Como paso previo al estudio funcional de PKD, quisimos analizar la localización de los distintos mutantes fusionados a GFP que íbamos a utilizar en nuestro sistema celular.

Así como puede observarse en la figura R22B, en los linfocitos T constitutivamente polarizados en ausencia de estímulo, GFP-PKD1wt y GFP-PKD1ca presentaban una localización citoplasmática ligeramente enriquecida en un polo de la célula, mientras que la distribución de GFP-PKD1km se aprecia mas restringida, probablemente asociada a algún compartimento intracelular, así como una cierta tinción de membrana. La localización de dichas construcciones es similar a la previamente observada por otros autores en linfocitos B quiescentes y mastocitos <sup>(169)</sup> así como en la línea de células T no polarizadas Jurkat <sup>(256)</sup>. De idéntica forma a lo observado en otros tipos celulares de origen hematopoyético <sup>(169)</sup>, la estimulación de las células Peer con é.f provoca la rápida translocación a la membrana plasmática de las distintas construcciones de PKD, una re-localización que no requiere de la actividad quinasa (Fig. R22B paneles +PDBu).

#### **R14.2- La sobre-expresión de PKD1wt, o de los mutantes activo o inactivo, no afecta a la polaridad de las células Peer**

Teniendo en cuenta, como hemos visto anteriormente (Figs. R9 y R17), que las vías de PKC participan en la

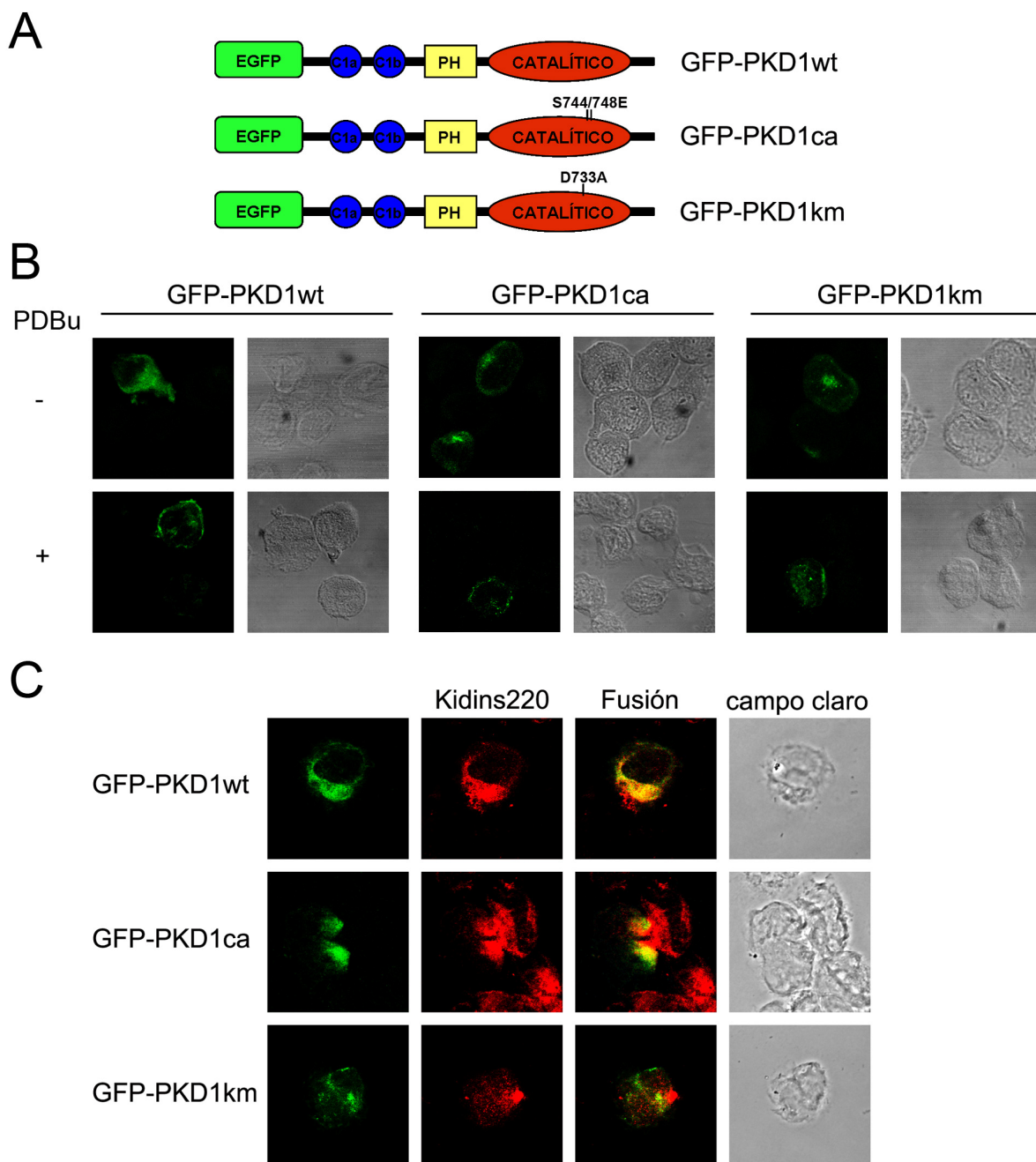
regulación de la distribución polarizada de Kidins220 e ICAM-3 en el urópodo de los linfocitos T constitutivamente polarizados, y sabiendo que PKD es un efector común de varias isoformas de esta familia de serín-treonín quinasas, nos planteamos si PKD estaba implicada o no en la regulación de la polaridad de las células Peer. Para ello decidimos estudiar el efecto de la sobre-expresión de GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca y GFP-PKD1km en la distribución polarizada de Kidins220 en la línea celular Peer mediante inmunofluorescencias y posterior análisis por microscopía confocal.

Como podemos observar tanto la versión silvestre, como el mutante activo de PKD1 presentaban una distribución parcialmente polarizada co-localizando con Kidins220. Ni la expresión de GFP-PKD1wt, ni la de GFP-PKD1ca provocaron la redistribución de Kidins220 (Fig. R22C) observada al estimular las vías de PKC con é.f (Fig. R9A y B). Tampoco el mutante GFP-PKD1km, cuya distribución difiere de las otras dos proteínas de fusión, modificaba la distribución celular de Kidins220 en esta línea constitutivamente polarizada. Estos resultados demuestran que PKD no regula la polaridad celular de la línea linfocitaria Peer.

#### **R15- PKD promueve la adhesión a fibronectina**

Diversos trabajos realizados en células de cáncer de mama demuestran la participación de PKD en los procesos de adhesión a la MEC. <sup>(22, 127, 199)</sup>. Así en dichas células la actividad de PKD ha sido relacionada con la adhesión a colágeno de tipo IV mediada por integrinas <sup>(127, 199)</sup>. Más recientemente, un estudio realizado en fibroblastos ha implicado a PKD en el reciclaje de la integrina  $\alpha v \beta 3$  a los contactos focales nacientes <sup>(300)</sup>.

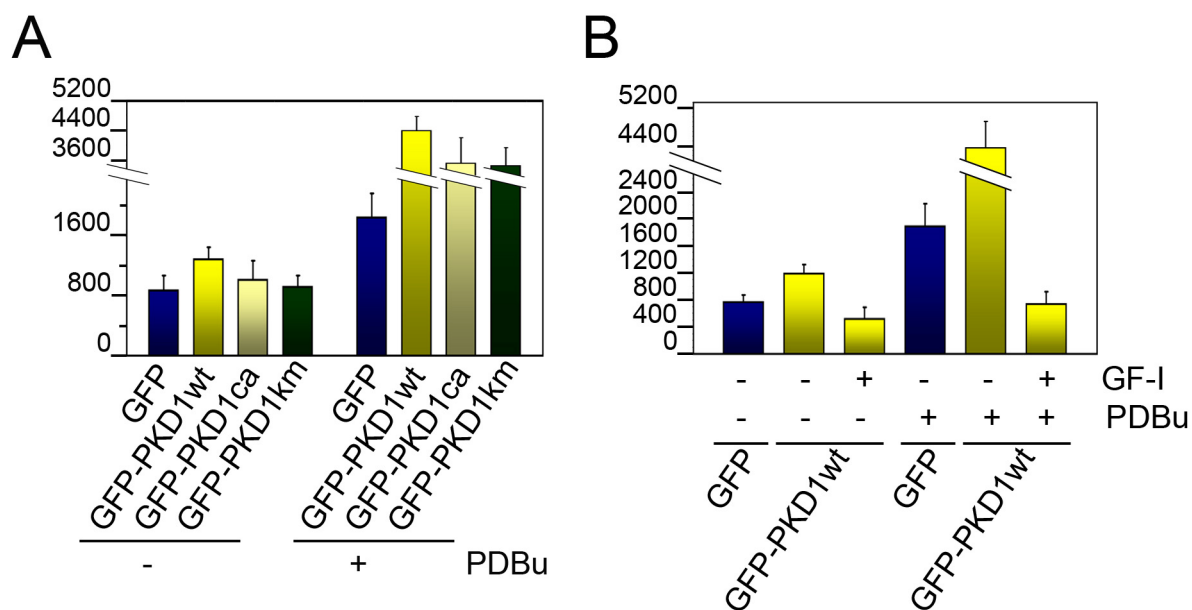
En linfocitos, la activación de las PKCs es uno de los principales mecanismos intracelulares por el cual se regula la actividad funcional de las integrinas. No en vano los é.f han sido descritos como potentes activadores de la adhesión a numerosos ligandos de las



**Figura R22. Distribución de GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca y GFP-PKD1km en células Peer y efecto de su expresión sobre la polaridad de dichas células**

**A-** Esquema ilustrativo de las tres construcciones de PKD1 empleadas en los ensayos funcionales. EGFP (en verde) fusionado al extremo N-terminal de PKD. **B-** Células Peer transfectadas con GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca o GFP-PKD1km fueron sembradas sobre cubreobjetos recubiertos con Fn (25µg/ml) y estimuladas (+) o no (-) durante 15min con PDBu (200nM) para, tras la fijación, analizar la distribución de las distintas proteínas de fusión mediante microscopía confocal. Las imágenes presentadas corresponden a la proyección máxima de una serie completa de secciones. **C-** Las células Peer transfectadas con GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca o GFP-PKD1km fueron sembradas sobre cubreobjetos recubiertos con Fn (25µg/ml), fijadas y posteriormente teñidas con anti-Kidins220 (rojo) para determinar el efecto de la sobreexpresión de las distintas construcciones en la distribución polarizada de Kidins220 en células Peer. Las imágenes presentadas corresponden a la proyección máxima de una serie completa de secciones.

integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . Siendo PKD un conocido efector común de las PKC y teniendo en cuenta todos los



**Figura R23.** Efecto de la sobreexpresión de GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca y GFP-PKD1km en la adhesión a fibronectina de las células Peer.

**A-** Células Peer transfectadas con GFP, GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca o GFP-PKD1km fueron sembradas sobre pocillos recubiertos con Fn (25µg/ml) y tras 1h de incubación fueron estimuladas(+) o no(-) con PDBu (200nM) durante 15min. Las células adheridas a los pocillos fueron fijadas y teñidas con Cristal Violeta para tras la elución del colorante medir la absorbancia en un luminómetro. **B-** Para determinar si los efectos promovidos por la sobreexpresión de GFP-PKDwt eran regulados por las vías de PKC se repitieron ensayos de adhesión a Fn como en el apartado anterior. En este caso las células Peer transfectadas con GFP (control) o con GFP-PKDwt fueron incubadas 1h, pretratadas (+) o no (-) con GF-I (3,5µM) durante 1h y posteriormente estimuladas o no con PDBu (200nM) durante 15min. Se procedió a cuantificar el número de células adheridas al igual que en el apartado (A). En ambos casos (A y B), y para cada experimento, se realizaron dos transfecciones transitorias independientes de cada construcción y se sembraron cuadruplicados de cada condición. Los resultados mostrados son una media de los valores obtenidos para cada condición de un experimento representativo. En ordenadas (eje y) viene representada la absorbancia a 595nm.

datos arriba mencionados, nos planteamos estudiar el posible papel que PKD pudiera estar desempeñando en la regulación de la adhesión de los linfocitos T polarizados a la MEC.

Decidimos pues analizar el efecto de la sobre-expresión de las distintos mutantes de PKD en la adhesión de células Peer a Fn. Para ello se llevaron a cabo ensayos de adhesión a Fn de células Peer sin estimular o estimuladas con PDBu expresando GFP, GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca o GFP-PKD1km (Fig. R23A).

En ausencia de estímulo, las células transfectadas transitoriamente con GFP-PKD1wt presentaban un incremento de adhesión de 1,5 a 2 veces con respecto a las células GFP control. Sin embargo, la sobre-

expresión de GFP-PKD1ca y de GFP-PKD1km no parecía afectar a la adhesión basal.

Al estimular las células con PDBu, las diferencias en la adhesión a Fn entre la población control y las células que expresaban GFP-PKD1wt se magnificaban llegando a ser el incremento de 2,5 a 2,7 veces. Tras la estimulación con PDBu, y contrariamente a lo observado en la situación basal, tanto la sobre-expresión de GFP-PKD1ca como la de GFP-PKD1km provocaban un aumento de adhesión que, sin llegar a ser tan significativo como en el caso de GFP-PKD1wt, daban lugar a incrementos de hasta 2 veces con respecto al control (Fig. R23A).

El comportamiento similar de las poblaciones de células que sobre-expresan GFP-PKD1ca y GFP-

PKD1km bien podría denotar que el efecto de PKD sobre la adhesión a Fn es independiente de su actividad quinasa, sin embargo ninguno de los mutantes es capaz de producir los efectos de la versión silvestre. Este hecho plantea la existencia de mecanismos adicionales (que probablemente requieran de las Ser744 y Ser748 del lazo de activación intactas) capaces de regular la correcta función de PKD en el proceso de adhesión a Fn.

A su vez la diferencia entre la situación basal, donde solo GFP-PKD1wt estimula la adhesión, y la situación en respuesta a PDBu, donde las tres proteínas GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca y GFP-PKD1km promueven un aumento considerable de la adhesión a Fn bien puede explicarse por la importancia de la localización de PKD en su función, puesto que como vimos en la figura R22B la estimulación con é.f de las células Peer provoca la rápida translocación a la membrana plasmática de las distintas construcciones de PKD.

Por lo tanto, nuestros datos parecen sugerir que la translocación de PKD a la membrana plasmática y la correcta regulación de su distribución son cruciales para incrementar la adhesión a Fn por parte de PKD independientemente de su actividad quinasa.

Muy recientemente, durante el desarrollo de esta tesis, y en connivencia parcial con estos resultados, el grupo del Dr. Yoji Shimizu ha descrito la participación de PKD en la adhesión a Fn de la línea de linfocitos T Jurkat, postulando el papel de PKD en la regulación del *clustering* o agrupamiento de las integrinas  $\beta 1$  de un modo independiente de su actividad quinasa<sup>(176)</sup>.

Quisimos a continuación comprobar si los aumentos en la adhesión ligados a la sobre-expresión de PKD eran dependientes de las vías de PKC, para ello se realizaron ensayos de adhesión en células Peer transfectadas con GFP-PKD1wt., pre-tratadas o no con el inhibidor específico de PKC GF-I, en ausencia o presencia de PDBu.

Como puede observarse en la figura R23B, los incrementos que obtuvimos tanto en la adhesión basal

como en la promovida tras la estimulación con PDBu al expresar GFP-PKD1wt eran totalmente erradicados al pre-tratar las células con GF-I. Dicho resultado demuestra que PKD juega un papel como efector de las vías de PKC en la adhesión a Fn.

## **R16- PKD participa en la adhesión homotípica célula-célula de los linfocitos T**

Un estudio reciente ha relacionado la actividad de PKD con la agregación celular en células de cáncer de próstata<sup>(115)</sup>. En dicho trabajo la sobre-expresión de PKD provoca una mayor agregación de dichas células mientras que su inhibición farmacológica conduce al efecto contrario.

En linfocitos T, la agregación celular o adhesión homotípica está mediada por interacciones de distintas moléculas de adhesión entre las que juegan un papel muy destacado la integrina  $\alpha L\beta 2$  o LFA-1 y sus ligandos ICAM-1,-2 y-3.

Teniendo en cuenta como hemos visto anteriormente (figs. R20 y R21) que ICAM-3 es sustrato de PKD y sabiendo que diversos trabajos han implicado a PKD en procesos mediados por integrinas<sup>(22, 176, 199, 300)</sup> nos propusimos estudiar el papel de PKD en la adhesión homotípica de los linfocitos T.

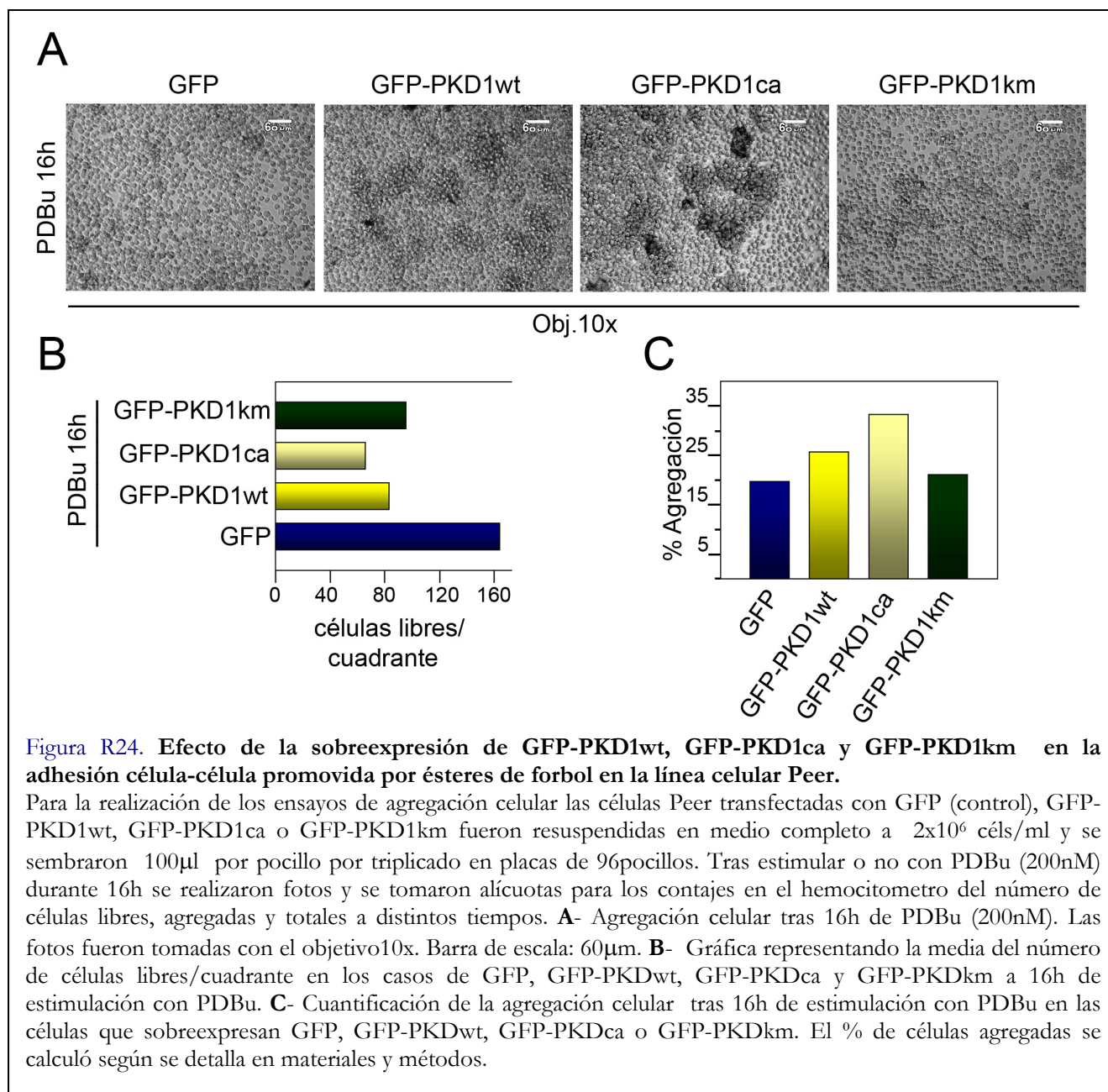
### **R16.1- PKD aumenta la adhesión intercelular promovida por PDBu**

Para estudiar el posible efecto de PKD en la adhesión célula-célula en linfocitos T llevamos a cabo ensayos de agregación en presencia de PDBu. Los é.f de forbol son potentes activadores de la adhesión homotípica en linfocitos, un hecho que en condiciones de alta densidad celular provoca la agregación de las células.

Para llevar a cabo este tipo de ensayos, células Peer transfectadas con GFP, GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca o GFP-PKD1km fueron sembradas a  $2 \times 10^6$  céls/ml y estimuladas con PDBu.

Tras 16h de tratamiento, las fotografías de las células mostraron una clara diferencia en la agregación inducida por PDBu en las poblaciones transfectadas





con GFP-PKDwt frente a la observada en las células expresando GFP o la versión quinasa muerta del enzima. Estas diferencias eran aún más llamativas en las células que expresaban PKD constitutivamente activa (Fig. R24A).

Con objeto de cuantificar las marcadas diferencias observadas en las fotografías se tomaron alícuotas de los distintos pocillos para determinar el número de células libres, el de células agregadas y el de células totales mediante conteje en el hemocitómetro. Como muestra la figura R24B, tras 16h de tratamiento con PDBu el número de células libres por cuadrante en la

población transfectada con GFP era muy superior al encontrado en la población expresando GFP-PKD1wt. La expresión del mutante constitutivamente activo GFP-PKD1ca disminuía aún más el número de células libres, mientras que en el caso del mutante GFP-PKD1km el número de células libres era algo mayor que en el caso de GFP-PKD1wt pero considerablemente menor al de las células control (Fig. R24B). A su vez, tanto el porcentaje de células agregadas frente a células totales a 16h de tratamiento, como el tamaño de estos agregados era visiblemente mayor en el caso de las células transfectadas con GFP-

PKD1ca y GFP-PKD1wt frente a las células que expresaban GFP-PKD1km o GFP sola (Fig. R24C). Los aumentos en la agregación celular promovida por el PDBu dependen por lo tanto del estado de activación de PKD, demostrando que la actividad de esta quinasa está directamente relacionada con la adhesión homotípica de las células T polarizadas.

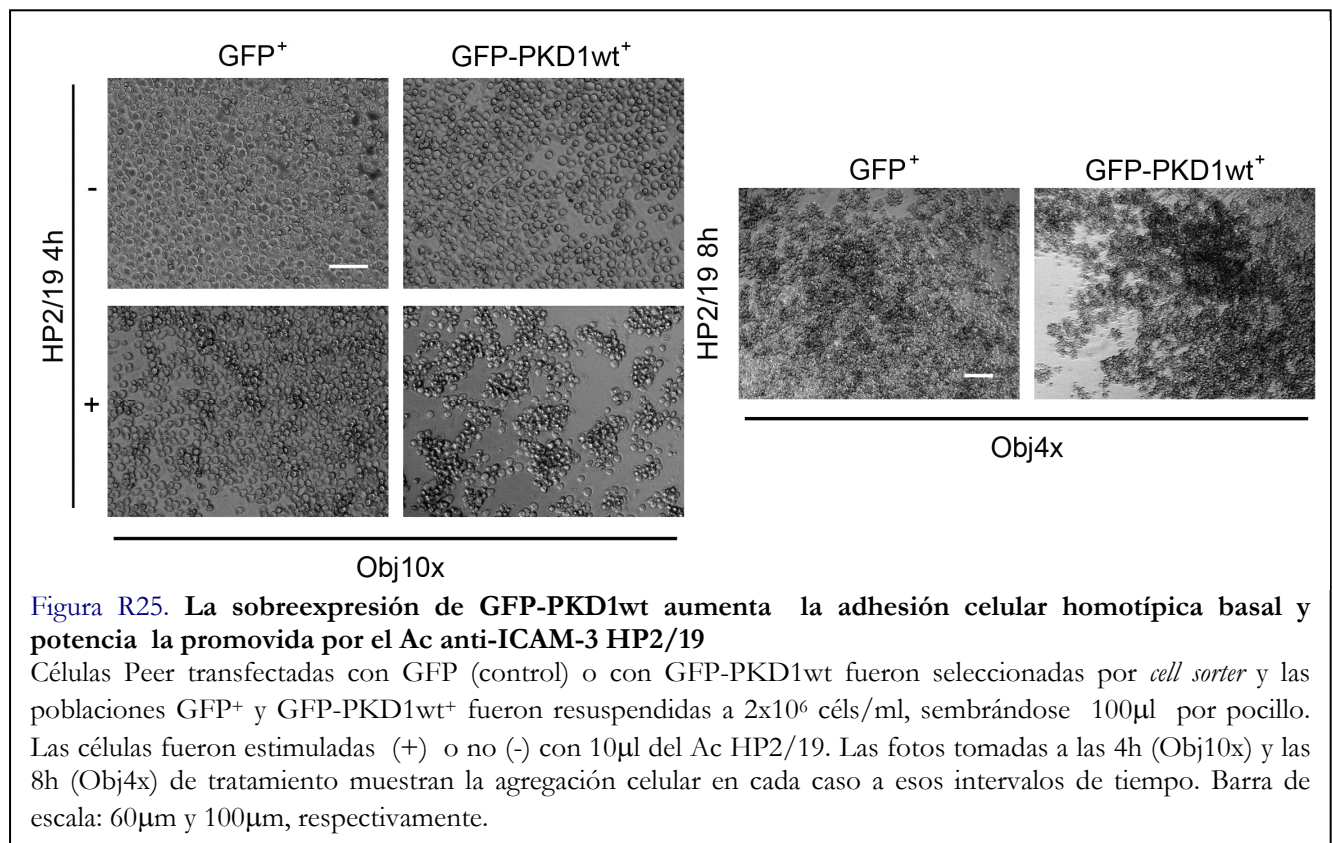
### R16.2- PKD aumenta la adhesión intercelular basal y la promovida por la activación de ICAM-3

Diversos estudios realizados en el pasado demostraron la implicación de ICAM-3 en los procesos de adhesión célula-célula tanto en linfocitos T como en otras células hematopoyéticas. Dichos resultados se obtuvieron incubando las células con varios Ac anti-ICAM-3 que se unen a la región externa de la proteína encargada del reconocimiento de LFA-1, promoviendo fenómenos de agregación celular <sup>(11, 12, 29, 64)</sup>. Entre estos Ac, el HP2/19 es uno de los que mejor promueve agregación en linfocitos T <sup>(11, 29)</sup>, regulando a su vez la adhesión de estos a componentes de la MEC <sup>(30)</sup>. Su actividad pro-

agregatoria no parece sin embargo generalizarse en otro tipo de interacciones inmunes, así otros estudios han demostrado que HP2/19 bloquea las interacciones celulares entre linfocitos y células de Langerhans <sup>(258)</sup> mientras que no afecta a la agregación de los neutrófilos <sup>(64)</sup>.

Tras demostrar que la expresión de PKD en su versión silvestre y constitutivamente activa aumentan la agregación inducida por PDBu en células Peer, decidimos estudiar cual era el efecto de la sobreexpresión de esta proteína sobre la agregación celular basal y la promovida en respuesta a la activación de ICAM-3 por HP2/19.

Como ya hemos mencionado anteriormente, los é.f son potentes promotores de la adhesión célula-célula que da lugar al fenómeno de agregación celular además de funcionar como activadores de PKD. Por el contrario la agregación basal de las células Peer es un fenómeno más tenue que requiere de tiempos mucho más largos para alcanzar proporciones significativas. Por ello, y para poder determinar si PKD era capaz de promover



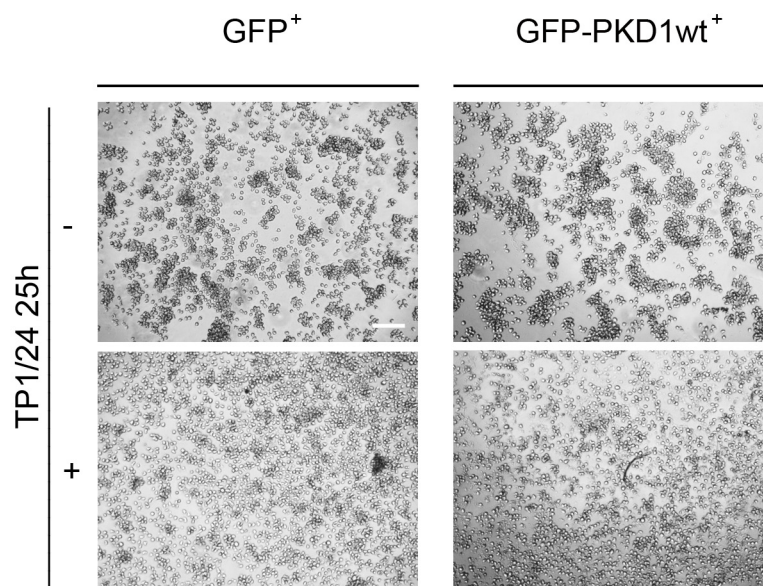
dicho proceso decidimos maximizar el porcentaje de células del cultivo que expresasen la proteína GFP-PKD1wt transfectada. Para ello trabajamos con poblaciones enriquecidas por *cell sorter* que expresaban nuestras proteínas en más de un 90% de las células. Las células Peer transfectadas con GFP o con GFP-PKD1wt y seleccionadas (población control GFP<sup>+</sup> y población GFP-PKD1wt<sup>+</sup>) fueron sembradas a 2x10<sup>6</sup> céls/ml en pocillos de una placa de 96 y tratadas o no con el Ac anti-ICAM-3 pro-agregatorio HP2/19. La expresión de PKD1wt promovía un ligero aumento de la adhesión intercelular basal, efecto que se veía potenciado tras estimular dichas células con el Ac HP2/19 (Fig. R25).

Estos resultados demuestran que la sobre-expresión de PKD promueve la adhesión intercelular homotípica en linfocitos T polarizados. Adicionalmente, la expresión de PKD provoca que la acción de ICAM-3 sobre procesos pro-agregatorios aumente sugiriendo la participación de PKD en alguna de las vías de

señalización de ICAM-3 activadas por el Ac HP2/19 que mimetiza la unión del ligando a dicha molécula de adhesión.

### R16.3- La adhesión intercelular homotípica promovida por PKD es dependiente de ICAM-3

Para determinar si la agregación basal promovida por la expresión de PKD era dependiente de ICAM-3, volvimos a realizar ensayos de agregación con células Peer transfectadas y seleccionadas por *cell sorter*. En este caso las poblaciones de células GFP<sup>+</sup> y GFP-PKD1wt<sup>+</sup> fueron sembradas a 1x10<sup>6</sup> céls/ml y tratadas con el Ac bloqueante anti-ICAM-3 TP1/24 previamente utilizado en otros trabajos para bloquear adhesiones celulares mediadas por ICAM-3 <sup>(29, 30)</sup>. Tras 25h se tomaron fotografías de los pocillos, observándose una mayor agregación basal (con unos agregados de mayor tamaño) en la población GFP-PKD1wt<sup>+</sup> que en la población control (Fig. R26). Tanto en la población GFP<sup>+</sup> como en la GFP-PKD1wt<sup>+</sup> el tratamiento con



**Figura R26. La adhesión célula-célula promovida por la sobreexpresión de PKD es dependiente de ICAM-3**

Células Peer transfectadas transitoriamente con GFP (control) o con GFP-PKDwt fueron seleccionadas por *cell sorter* y las poblaciones GFP<sup>+</sup> y GFP-PKD1wt<sup>+</sup> fueron resuspendidas a 1x10<sup>6</sup> céls/ml, sembrándose 100µl por pocillo. Las células fueron tratadas con el Ac TP1/24 bloqueante de las interacciones mediadas por ICAM-3 durante 25h a una dilución 1/20. Las fotografías fueron tomadas con el Obj4x y muestran la agregación celular en cada caso. Barra de escala: 100µm.



este Ac bloqueante de las interacciones mediadas por ICAM-3 inhibía completamente la agregación (Fig. R26, + TP1/24).

Estos datos sugieren que la adhesión intercelular homotípica promovida por la sobre-expresión de PKD en linfocitos T es dependiente de ICAM-3.

#### R16.4- La activación de ICAM-3 promueve la activación/fosforilación de PKD

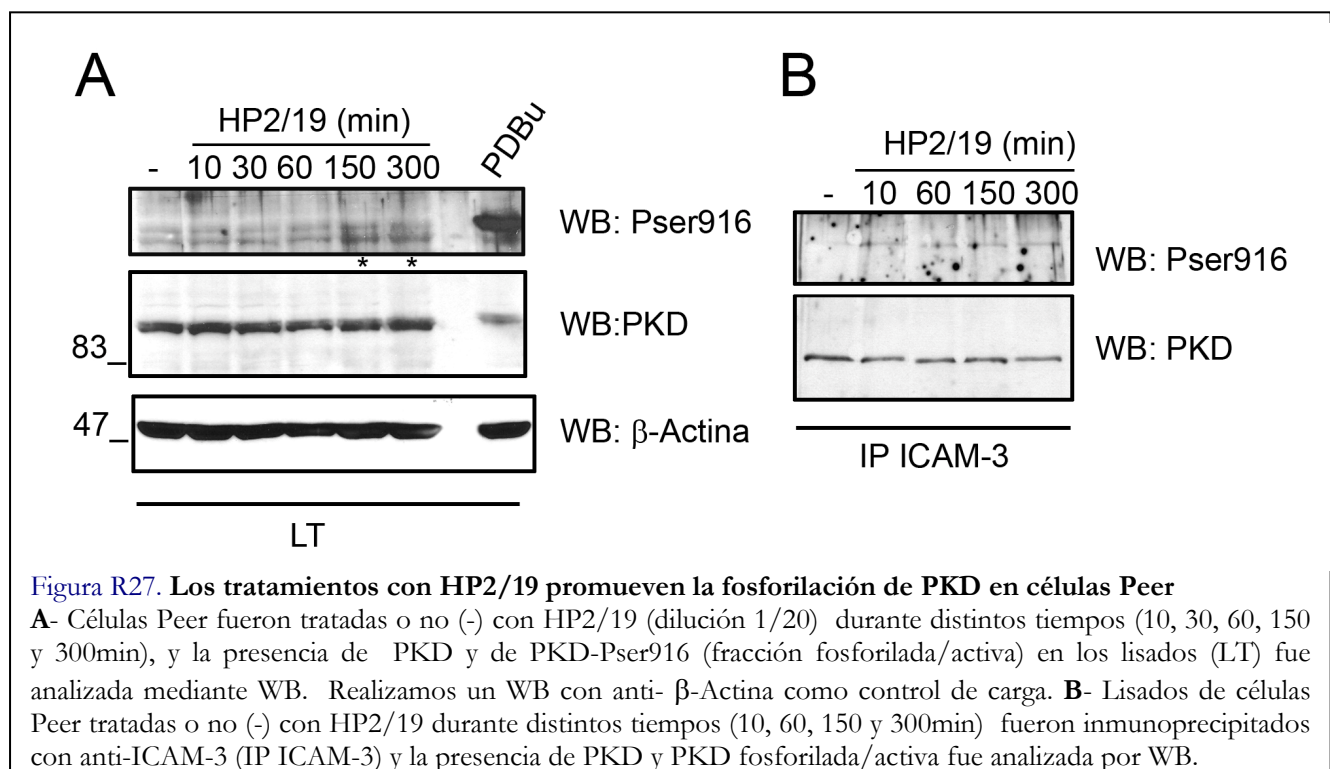
Un estudio realizado en neutrófilos demostró que la agregación inducida con Ac anti-ICAM-3 era sensible a inhibidores de PKC, sugiriendo la participación de dichas vías en la señalización *outside-in* promovida por la puesta en marcha de ICAM-3<sup>(64)</sup>. Teniendo en cuenta que PKD es un efector común de las vías de PKC y que es capaz de fosforilar *in vitro* a ICAM-3 como hemos demostrado anteriormente (Figs. R20-R21), nos propusimos analizar si esta quinasa era activada en respuesta a la activación de ICAM-3 mediante el uso de Ac pro-agregatorios.

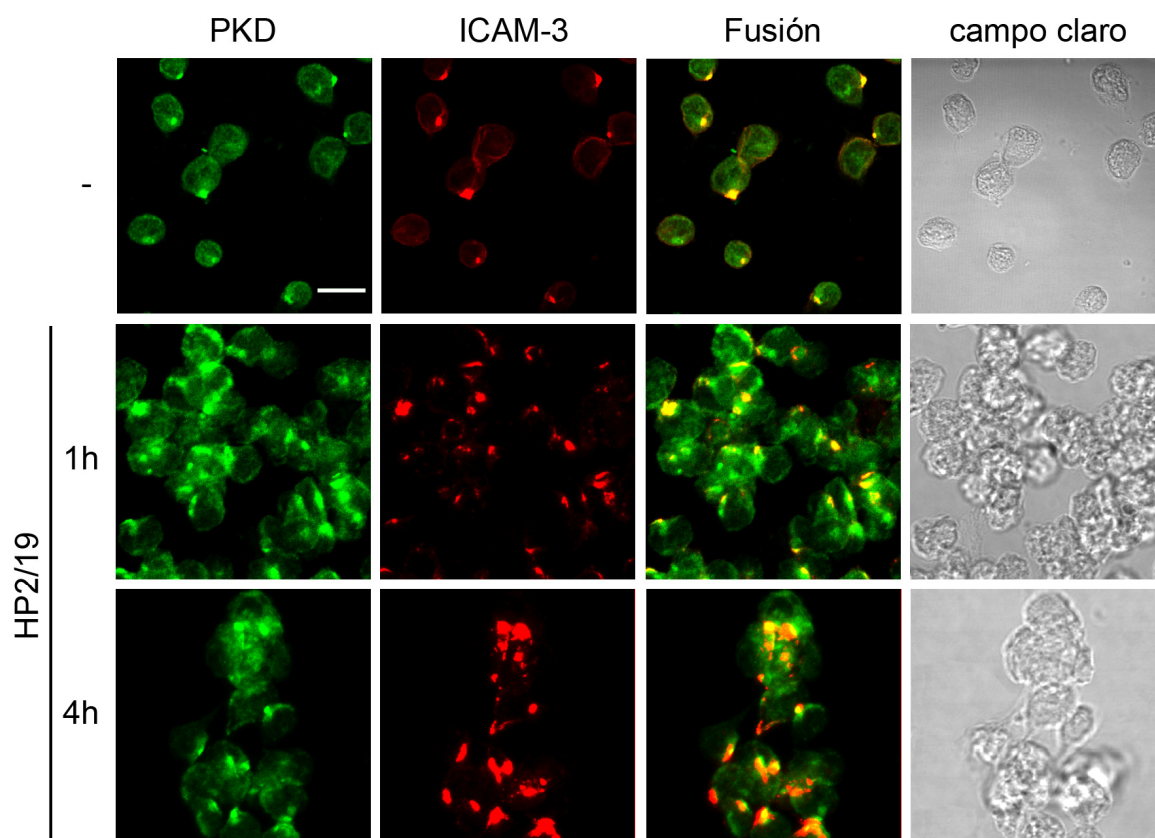
Para ello las células Peer fueron estimuladas a distintos tiempos con el Ac anti-ICAM-3 pro-agregatorio HP2/19 y se analizó la presencia de PKD

fosforilada/activa en los lisados de dichas células mediante WB con el Ac anti-Pser916.

Pudimos comprobar que los tratamientos con anti-ICAM-3 HP2/19 promovían una lenta pero sostenida fosforilación de PKD, mostrando un máximo de fosforilación a las 2h30 y 5h (Fig. R27A). Esta fosforilación es muy distinta a la inducida por PDBU, probablemente debido a que estímulos más fisiológicos que activen PKD no sean tan potentes como los é.f (que inducen una rápida y robusta fosforilación de PKD, que provoca incluso un cambio de movilidad electroforética de la quinasa).

Acto seguido, decidimos estudiar si estas mismas condiciones promovían la interacción entre ICAM-3 y PKD. Para ello las células Peer estimuladas durante distintos tiempos con HP2/19 fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anti-ICAM-3 analizando por WB la presencia de PKD-Pser916 y PKD total en los inmunoprecipitados. Los tratamientos con HP2/19 aumentaban ligeramente la fracción activa de la quinasa que interacciona con ICAM-3 (Fig. R24B panel superior, WB anti-Pser916) mientras que no parecían modificar la interacción cuando se utilizó el Ac contra





**Figura R28. Distribución subcelular de PKD en células Peer en respuesta a estimulación con HP2/19**

Células Peer sembradas sobre cubreobjetos con Fn (25µg/ml) fueron o no (-) estimuladas con HP2/19 durante 1 y 4h. Tras observarse la formación de agregados celulares, las células fueron fijadas y teñidas con anti-ICAM-3 y anti-PKD. Las imágenes de microscopía confocal presentadas corresponden a la proyección máxima de una serie completa de secciones

PKD total con ICAM-3 (Fig. R27B panel inferior, WB PKD).

Estos resultados demuestran que, en la línea de linfocitos T polarizados Peer, la activación de ICAM-3 con el Ac HP2/19 (Ac que reconoce el sitio de unión a LFA-1 de ICAM-3) promueve la fosforilación/activación de PKD sostenida en el tiempo y aumenta ligeramente la interacción de la fracción activa de la quinasa con ICAM-3.

La redistribución de PKD tras su activación en respuesta a diferentes estímulos ha sido ampliamente estudiada en diferentes sistemas celulares <sup>(228)</sup>. A su vez, su localización intracelular parece ser importante para la función de la proteína en linfocitos T <sup>(160)</sup>. Nos propusimos por lo tanto estudiar los efectos del

tratamiento con HP2/19 sobre la distribución intracelular de PKD.

Para ello llevamos a cabo inmunofluorescencias dobles con anti-PKD y anti-ICAM-3 en células Peer sin estimular o estimuladas durante distintos periodos de tiempo con el Ac pro-agregatorio HP2/19. Como puede observarse en la figura R28, ni la distribución polarizada de PKD, ni la co-localización de esta quinasa con ICAM-3 sufren grandes cambios tras la estimulación de agregación celular con el Ac HP2/19. Todo lo más que pudo comprobarse fue un ligero aumento de la acumulación de ambas proteínas en determinadas zonas de la célula.

**R16.5 Estudio de la distribución de PKD en respuesta al Ac HP2/19 en la línea de linfocitos T no polarizada JHM1-2.2**

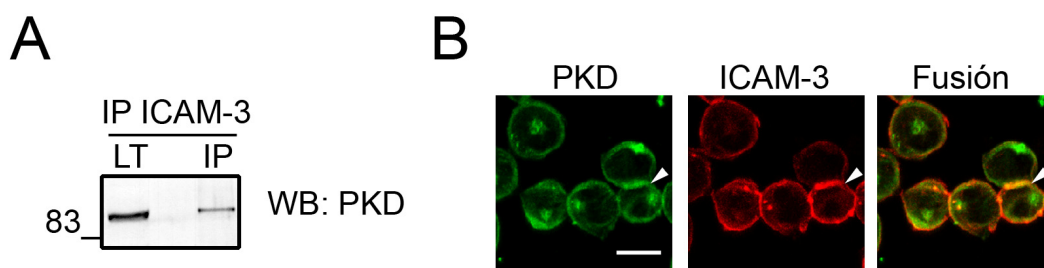
Puesto que los resultados obtenidos en la línea de linfocitos T Peer no mostraban ningún cambio sustancial en la localización ya de por sí polarizada de PKD, decidimos cambiar de aproximación y utilizar otra línea de linfocitos T, JHM1-2.2, que a diferencia de la línea Peer, no presenta una distribución constitutivamente polarizada de ICAM-3.

En primer lugar, quisimos investigar si en este modelo celular no polarizado PKD seguía interaccionando con ICAM-3. Para ello se prepararon inmunoprecipitados de ICAM-3 procedentes de lisados de células JHM1-2.2 que fueron analizados por WB con anti-PKD. Como se observa en la figura R29A, la presencia de PKD en dichos inmunoprecipitados demuestra claramente la interacción entre ambas proteínas en esta línea de linfocitos T no polarizados. A su vez, las tinciones dobles reflejaban un cierto grado de co-localización entre ambas proteínas, estando PKD significativamente enriquecido en la membrana y en un compartimento subcelular (Fig. R29B). Cabe destacar que tanto PKD como ICAM-3 aparecen muy concentradas y colocalizando en ciertas zonas de interacción intercelular (Fig. R29B, zonas señaladas con puntas de flecha).

Acto seguido nos propusimos analizar el efecto del tratamiento con HP2/19 en la distribución de PKD en esta línea de linfocitos T no polarizados. PKD es una

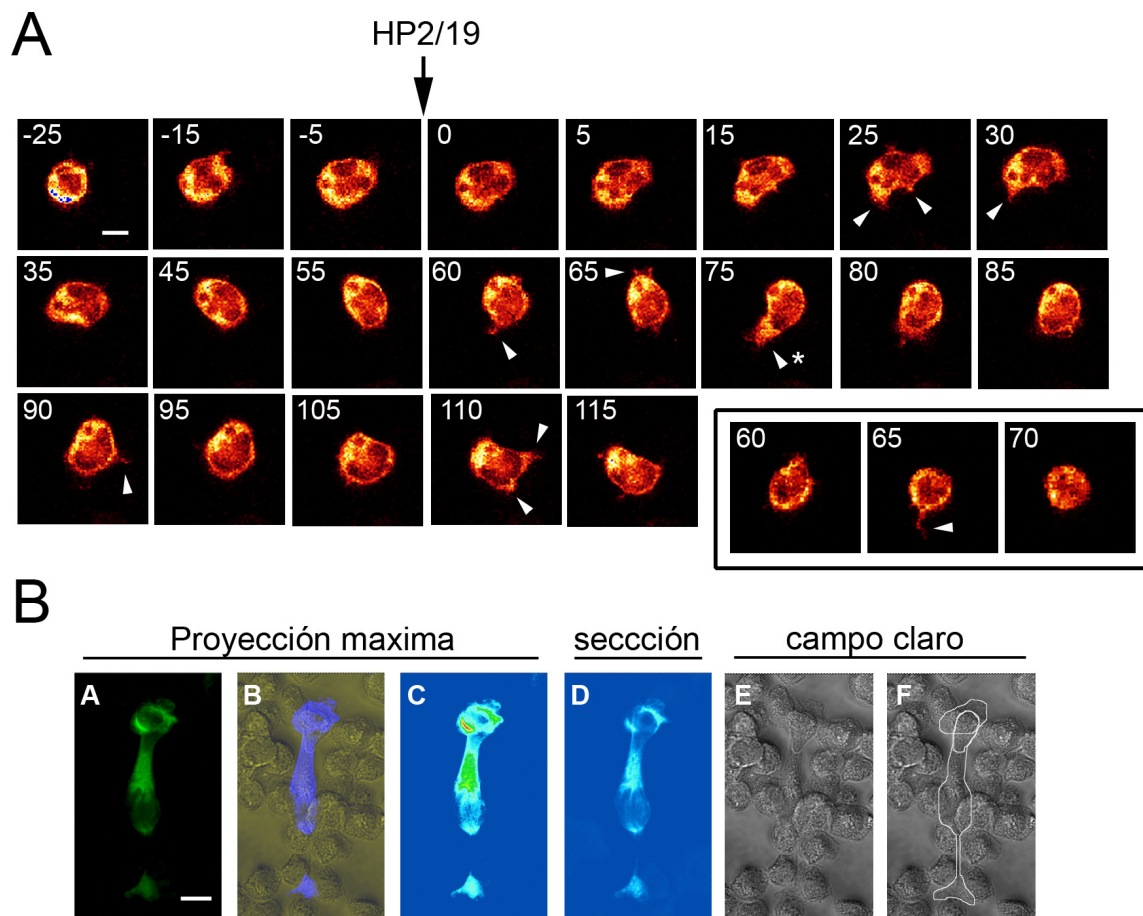
molécula cuyos procesos de redistribución son sumamente dinámicos <sup>(228)</sup>. Para no perder detalle de los posibles cambios de localización rápidos y reversibles que pudiesen estar produciéndose, decidimos transfectar las células JHM1-2.2 con la proteína de fusión GFP-PKD1wt y monitorizar la dinámica redistribución de la molécula en ensayos de microscopía confocal *in vivo*. Para ello, las células transfectadas con GFP-PKD1wt fueron grabadas durante 2h en ausencia (control) o en presencia de HP2/19. Las imágenes tomadas en intervalos de 5min durante las 2h mostraron el enorme dinamismo de la proteína GFP-PKD1wt que presentaba una constante redistribución a las extensiones celulares que se producen en estas células (Fig. R30A). Sin embargo, no apreciamos ninguna diferencia en la dinámica de redistribución de GFP-PKD1wt durante estas 2h de grabación entre las células sin estimular y estimuladas con HP2/19.

La fijación posterior al ensayo de video-microscopía confocal de las células JHM1-2.2 seguida de un nuevo análisis por microscopía confocal de las células transfectadas permitió la obtención de una “foto fija” de las prolongaciones celulares características emitidas por estas células y que permiten establecer contactos con las células vecinas (Fig. R30B). Cabe destacar el enriquecimiento de GFP-PKDwt en los extremos de



**Figura R29. PKD interacciona y colocaliza parcialmente con ICAM-3 en células T no polarizadas JHM1-2.2**

**A-** Lisados de células JHM1-2.2 fueron inmunoprecipitados con anti- ICAM-3 (IP ICAM-3) y la presencia de PKD en los inmunoprecipitados fue comprobada por WB. **B-** Células JHM1-2.2 fueron sembradas sobre cubreobjetos recubiertos con Fn (25μg/ml) y teñidas con anti-PKD (verde) y anti-ICAM-3 (rojo). Las imágenes de microscopía confocal presentadas corresponden a la proyección máxima de una serie completa de secciones. La punta de flecha señala un contacto intercelular. Barra de escala: 4μm.



**Figura R30. Estudio del efecto de HP2/19 en la localización *in vivo* de GFP-PKDwt en células JHM1-2.2**

**A-** Para el estudio del efecto de HP2/19 en la distribución de GFP-PKD1wt *in vivo* se realizaron ensayos de microscopía confocal *in vivo* de células JHM1-2.2 transfectadas con GFP-PKD1wt. Se tomaron imágenes cada 5min. Tras 30min se estimularon con HP2/19 continuándose la grabación durante 2h. No se apreció diferencia alguna en la distribución de GFP-PKD1wt entre las células tratadas con HP2/19 y las control (sin tratar) por lo que solo se presentan imágenes de las primeras. Todas las imágenes de microscopía confocal presentadas corresponden a la proyección máxima de una serie completa de secciones. Barra de escala: 2μm. **B-** Imagen de microscopía confocal tomada tras la fijación posterior al ensayo *in vivo* representativa del tipo de prolongaciones celulares que se producen en estas células. En la imagen pueden apreciarse 3 células transfectadas con GFP-PKD1wt interaccionando entre sí y con las células vecinas a través de prolongaciones celulares. Los paneles presentados corresponden respectivamente a proyecciones máximas de GFP (panel A), en colores artificiales (panel C) y en colores artificiales fusionado al campo claro (panel B). También se muestra una sección individual en colores artificiales (panel D) donde se aprecia levemente toda la extensión celular y dos paneles únicamente con el campo claro (panel E) y el campo claro con el contorno de las células que expresan la proteína de fusión trazado (panel F). Barra de escala: 4μm.

estas prolongaciones.

Teniendo en cuenta que PKD interacciona con ICAM-3 tanto en células T constitutivamente polarizadas como sin polarizar, que se fosforila/activa en respuesta a la activación de esta molécula de adhesión y que es capaz de fosforilar a esta proteína *in vitro*, nos propusimos estudiar qué repercusión podría tener la

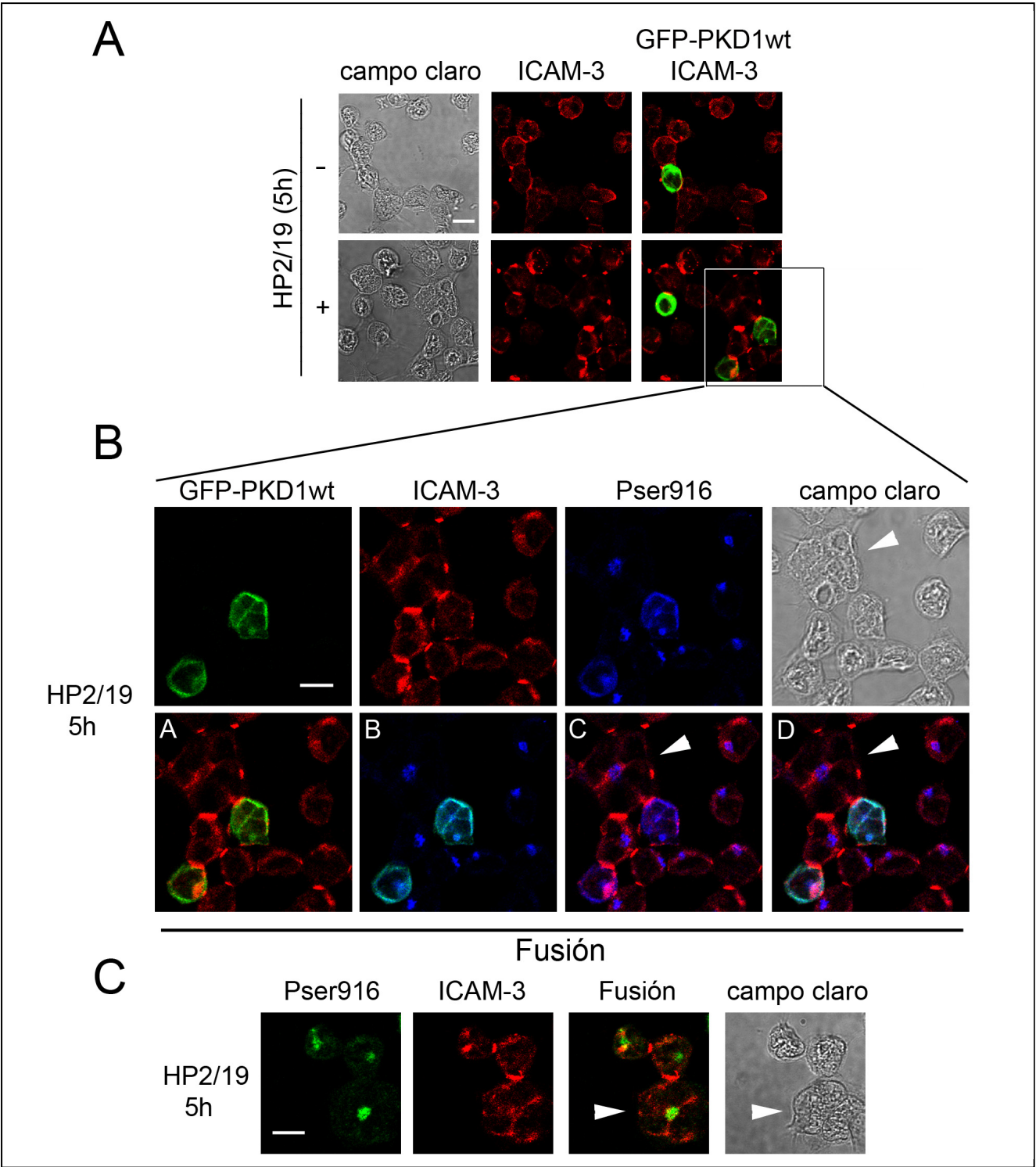
sobre-expresión de la versión silvestre de PKD1 en el reagrupamiento de ICAM-3 promovido por HP2/19 en un modelo celular donde ICAM-3 no se encuentra constitutivamente polarizada. Para ello se realizaron inmunofluorescencias dobles con los Ac anti-ICAM-3 y anti-Pser916 de células JHM1-2.2 transfectadas con GFP-PKD1wt y se analizó tanto la localización de la



quinasa como el proceso de redistribución de ICAM-3 tras la incubación con HP2/19.

Como se observa en las imágenes de microscopía confocal de la figura R31A, la distribución de ICAM-3 en células sin tratar era más o menos homogénea a lo largo de la membrana plasmática mientras que tras 5h de incubación con HP2/19 se reagrupaba,

concentrándose en las zonas de contacto entre células. Por otra parte, la expresión de GFP-PKD1wt no alteró en nada la distribución de ICAM-3 ni en ausencia ni en presencia de HP2/19 (Fig. R31A) a pesar de que buena parte de la proteína de fusión se encuentra en estado fosforilado/activo como se denota en la tinción con anti-Pser916 (Fig. R31B, panel fusión B).



**Figura R31. Distribución de PKD en respuesta al Ac HP2/19 en la línea de linfocitos T no polarizados JHM1-2.2**

Las células JHM1-2.2 transfectadas con GFP-PKD1wt fueron sembradas sobre cubreobjetos recubiertos con Fn (25µg/ml) e incubadas (+) o no (-) con el Ac HP2/19 durante 5h. Tras la fijación las células fueron teñidas con anti-ICAM-3 y anti-Pser916. **A-** Los paneles presentan solo la tinción con ICAM-3 (rojo) y GFP-PKD (verde). Nótese que de idéntica forma a lo descrito previamente en linfocitos de sangre periférica, el Ac HP2/19 provoca el reagrupamiento de ICAM-3. Barra de escala: 4 µm. **B-** Resumen detallado de las inmunofluorescencias dobles obtenidas a 5h de tratamiento con HP2/19. Los paneles superiores presentan la localización de GFP-PKD1wt (verde) y las tinciones de ICAM-3 (rojo) y PKD-Pser916 (azul) por separado. Los paneles inferiores presentan las fusiones respectivas de GFP-PKD1wt con ICAM-3 (A), GFP-PKD1wt con PKD-Pser916 (B), ICAM-3 con PKD-Pser916 (C) y los tres juntos (D). Las puntas de flecha en los paneles campo claro y fusión C y D señalan el agregado celular. Barra de escala: 4 µm. **C-** Imágenes representativas del tipo de agregados celulares observados tras el tratamiento de las células JHM1-2.2 con HP2/19 (señalado con punta de flecha). Inmunofluorescencia doble anti-Pser916 (verde), anti-ICAM-3 (rojo). Nótese la concentración de la señal de PKD-Pser916 en el centro del grupo de células. Barra de tamaño: 4 µm. Todas las imágenes de microscopía confocal presentadas corresponden a la proyección máxima de una serie completa de secciones.

Por otro lado, en células JHM1-2.2 aisladas no transfectadas, al igual que ocurre en células Peer, la fracción fosforilada/activa de PKD endógena presenta una localización sumamente puntual que hace presagiar su asociación a un subcompartimento celular específico todavía por determinar (Fig. R31B panel Pser916).

A su vez, tras 5h de estimulación con HP2/19 podemos apreciar la aparición de agregados de múltiples células sumamente compactos (Fig. R31A 5h de tratamiento, señalados con una flecha en R31B y R31C). Llama la atención que al formarse estos agregados celulares en respuesta al Ac HP2/19, las fracciones fosforiladas/activas de PKD correspondientes a cada célula individual se concentran en el centro de dichos agregados en lo que parece ser la zona de unión de estos “racimos de células” (Fig. R31B paneles Pser916, fusión C y D y Fig. R31C).

Estos últimos resultados sugieren la posible implicación de PKD activa en el mantenimiento y/o formación de estos agregados

## **R17- PKD regula la migración, quimiotaxis y motilidad de las células Peer**

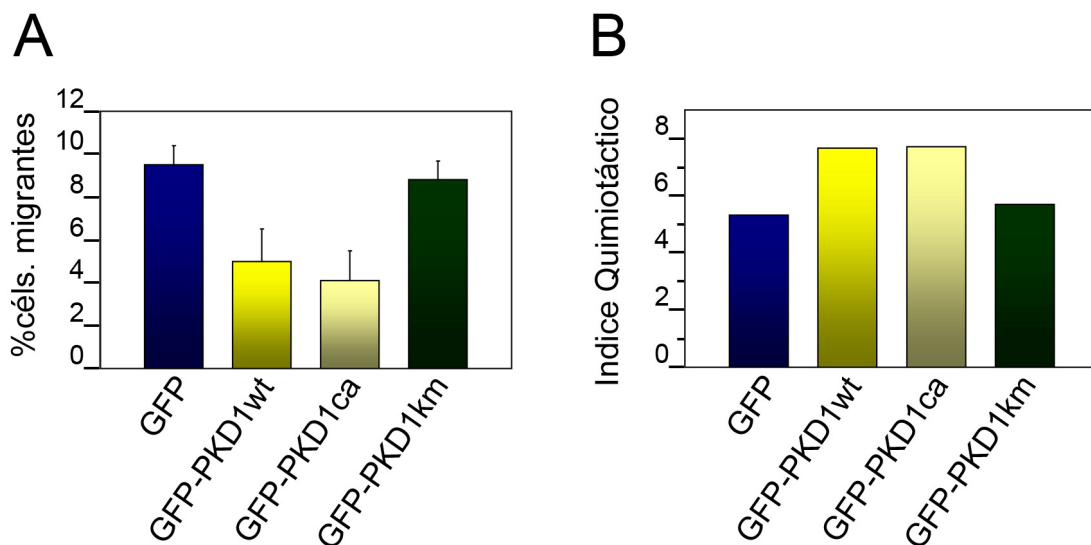
Los linfocitos T son células extraordinariamente motiles y la mayor parte de sus funciones dependen de su habilidad para migrar. La migración es una actividad íntimamente asociada a procesos de adhesión dinámicos dependiente de integrinas.

Como acabamos de comprobar, PKD está implicado en los procesos de adhesión célula-matriz y célula-célula en linfocitos T polarizados. Adicionalmente, trabajos recientes han postulado su participación en la migración de fibroblastos, células de cáncer de mama y células endoteliales <sup>(115, 210, 211, 300)</sup>. Sin embargo, no existen estudios relacionando a PKD con la migración de linfocitos.

### **R17.1- La actividad de PKD regula la trans-migración y la quimiotaxis frente a SDF-1α**

Nuestro siguiente objetivo fue por tanto dilucidar el posible papel de PKD en la migración de los linfocitos T polarizados, tanto en condiciones basales como en respuesta a gradientes quimioatrayentes. Para ello llevamos a cabo ensayos de migración en cámaras *transwell* de células Peer transfectadas con GFP (células control), así como con GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca y GFP-PKD1km en presencia o ausencia de la quimioquina SDF-1α.

En ausencia de estímulo, la expresión de la versión silvestre, así como del mutante constitutivamente activo, provocaban una disminución entorno al 50% de la migración con respecto a las células control. Dicho efecto inhibitorio es totalmente dependiente de la actividad quinasas, puesto que la sobre-expresión del mutante GFP-PKD1km no tenía ningún efecto sobre la migración basal (Fig. R32A).



**Figura R32. Efecto de la sobreexpresión de GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca y GFP-PKD1km en la migración de las células Peer en ausencia y en presencia del estímulo quimiotáctico SDF-1 $\alpha$**

Las células Peer transfectadas transitoriamente con GFP, GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca o GFP-PKD1km fueron resuspendidas a  $5 \times 10^6$  células/ml en RPMI con 0,1% de BSA para la realización de ensayos de migración en cámaras con poros o *transwells* en presencia o no de SDF-1 $\alpha$  (10 ng/ml). El número de células migratorias se determinó por citometría de flujo. Se realizaron triplicados de cada punto. **A**- Porcentaje de células que expresan las distintas construcciones (GFP positivas) que han migrado en ausencia de estímulo. **B**- Análisis de la quimiotaxis frente a SDF-1 $\alpha$  representado como índice quimiotáctico (ver materiales y métodos).

SDF-1 $\alpha$  es un potente quimioatrayente, cuya presencia estimula fuertemente la migración de las células Peer. En respuesta a dicha quimioquina la capacidad de migrar de las células que expresaban la versión silvestre o constitutivamente activa de PKD aumentaba hasta casi ocho veces mientras que el aumento de la migración en las células control no llegaba a cinco veces (Fig. R32B). Este incremento del índice quimiotáctico no se producía sin embargo en las células que expresaban GFP-PKD1km, demostrando que éste es dependiente de la actividad de PKD.

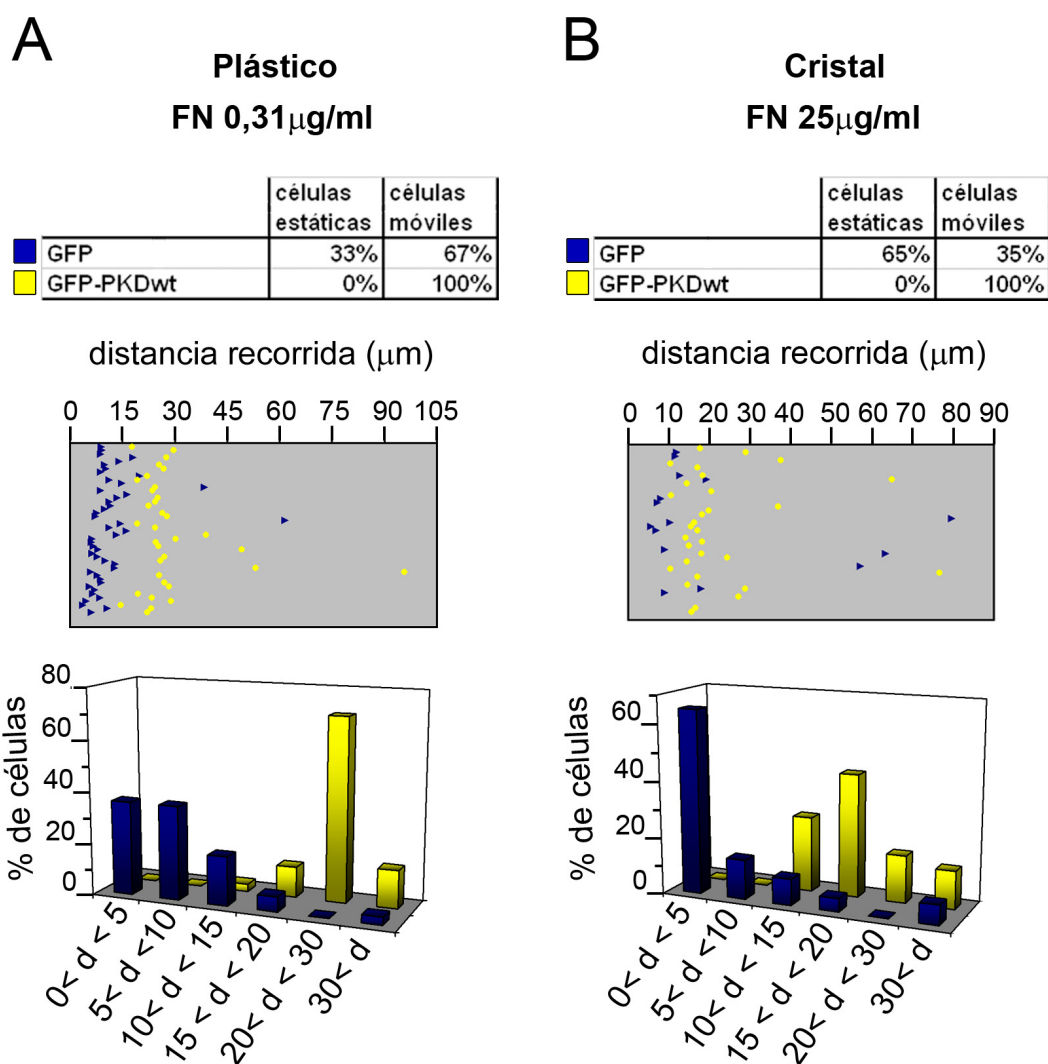
Estos resultados demuestran claramente la implicación de la actividad de PKD en los procesos de migración y quimiotaxis frente a SDF-1 $\alpha$  en células Peer. Significativamente, estos datos son los primeros en relacionar a esta quinasa con procesos de quimiotaxis.

#### **R17.2- PKD aumenta la motilidad sobre fibronectina en linfocitos T polarizados**

Como hemos mencionado anteriormente, diversos autores han implicado a PKD en los procesos de

migración celular<sup>(115, 210, 211, 300)</sup>. Sin embargo mientras el grupo del Dr. Balaji asociaba la sobre-expresión de PKD con una disminución de la migración en células de cáncer de próstata en ensayos en *transwells*<sup>(115)</sup>, otros autores, por el contrario, han observado un papel positivo de PKD en la regulación de la migración.

Así un estudio realizado en fibroblastos demostró mediante video-microscopía que la sobre-expresión del mutante PKD1km provoca una disminución de la velocidad de desplazamiento de dichas células<sup>(210)</sup>. También en fibroblastos y mediante ensayos de cicatrización de herida, otro trabajo relacionó a su vez la supresión de la expresión de PKD con ARNi con una disminución de la migración<sup>(300)</sup>. Por último, muy recientemente, otros autores han demostrado mediante el uso de mutantes constitutivamente activos para PKD, así como suprimiendo su expresión mediante ARNi, la implicación de la actividad de PKD en la estimulación de la migración en respuesta a VEGF-A<sup>165</sup> de las células endoteliales<sup>(211)</sup>. Dicho trabajo ahondaba aún más implicando la fosforilación en el



**Figura R33. Efecto de la sobreexpresión de GFP-PKD1wt en la motilidad de las células Peer**

Las células Peer transfectadas con GFP (control) y GFP-PKDwt fueron seleccionadas por *cell sorting* y las poblaciones obtenidas GFP<sup>+</sup> o GFP-PKD1wt<sup>+</sup> fueron resuspendidas a 2x10<sup>5</sup>céls/ml en medio completo para realizar los ensayos de video-microscopía sobre (A) pocillos de plástico recubiertos con Fn (0,31µg/ml) o (B) cubreobjetos de cristal recubiertos con Fn (25µg/ml). Los paneles superiores indican los porcentaje de células estáticas (que no realizan un cambio de posición) y de células móviles en cada caso. Los paneles centrales indican la distancia recorrida por aquellas células móviles en un experimento representativo. Células GFP<sup>+</sup> (triángulos azul oscuro), células GFP-PKDwt<sup>+</sup> (círculos amarillos). Los paneles inferiores comparan la motilidad de las dos poblaciones GFP<sup>+</sup> (barras azules), GFP-PKDwt<sup>+</sup> (barras amarillas), analizando el desplazamiento por intervalos de distancia (d) en µm y señalando el porcentaje de células de cada población dentro de cada intervalo.

lazo de activación de PKD en la migración de dichas células en respuesta a VEGF.

Debido a la controversia en el papel jugado por PKD en los procesos de migración celular, quisimos diseccionar en profundidad los motivos que daban lugar a la disminución de la migración en ausencia de estímulo, provocada por PKD en nuestro sistema celular.

Los ensayos de migración con cámaras con poros o *transwells* buscan mimetizar los procesos de trans-migración o extravasación celular, un fenómeno complejo donde las capacidades adhesivas de las células con el sustrato y entre ellas pueden dificultar o facilitar el proceso. Es importante por lo tanto diferenciar entre trans-migración y motilidad. La motilidad o desplazamiento locomotor de los linfocitos es un



proceso que se nutre de la coordinación entre las contracciones del CK y el anclaje-desprendimiento cíclico al sustrato en el frente de avance y la parte trasera. La motilidad está por tanto asociada con la adhesión al sustrato y se puede determinar como la velocidad de desplazamiento de las células, o lo que es lo mismo la distancia recorrida por estas durante un determinado intervalo de tiempo.

Para determinar como afectaba, la expresión de PKD en la motilidad de los linfocitos T polarizados llevamos a cabo ensayos de video-microscopía en células Peer transfectadas con GFP o con GFP-PKD1wt seleccionadas posteriormente por *cell sorting*. Siendo las eficiencias de transfección de un 30-40%, el uso de separadores celulares o *cell sorters* es fundamental puesto que nos asegura trabajar con poblaciones celulares GFP<sup>+</sup> o GFP-PKD1wt<sup>+</sup> donde todas las células del cultivo expresan la proteína transfectada. Esto es particularmente importante en este tipo de ensayos ya que, como es bien sabido, las poblaciones de linfocitos se comportan de manera heterogénea y no todas las células T se desplazan a la misma velocidad. De hecho en condiciones reales, en un nódulo linfático, los linfocitos T cambian constantemente su comportamiento pasando de estadios con baja motilidad a otros de rápido desplazamiento de forma continua <sup>(181)</sup>. Por lo tanto los resultados obtenidos en los ensayos de motilidad reflejan tendencias, ya que en cualquier cultivo celular habrá siempre células que se desplacen mucho más que otras.

Tras seleccionar las células, las poblaciones GFP<sup>+</sup> y GFP-PKD1wt<sup>+</sup> fueron sembradas sobre cristales recubiertos con altas concentraciones de Fn (25µg/ml) o directamente sobre pocillos de plástico recubiertos con Fn a bajas concentraciones (0,3µg/ml). Tras un periodo de 10min, para el asentamiento de las células, procedimos a realizar ensayos de video-microscopía de 30min de duración. Ya que el movimiento de los linfocitos es bastante errático, y teniendo estos la capacidad de “bailar sobre si mismos” adheridos a un mmo punto, decidimos establecer el movimiento en

función de la distancia recorrida en línea recta. Así tras el intervalo de 30min procedimos a medir el desplazamiento de cada una de las células del campo. Significativamente, todas las células de la población GFP-PKD1wt<sup>+</sup> eran motiles, desplazándose en mayor o menor medida tanto a bajas concentraciones de Fn sobre plástico como a altas concentraciones de dicho sustrato sobre cristal. Por el contrario, en la población control GFP<sup>+</sup> buena parte de las células permanecían estáticas (Fig. R33A y B, paneles superiores).

Centrándonos solo en las células móviles, pudimos comprobar que el desplazamiento de las células GFP-PKD1wt<sup>+</sup> era generalmente mayor al de las células GFP<sup>+</sup> (Fig. R33 A y B paneles centrales). De hecho, a bajas concentraciones de Fn, mientras que la mayor parte de las células GFP<sup>+</sup> recorren distancias lineales de entre 5-15 µm en 30min, en ese mismo intervalo de tiempo la mayor parte de las células de la población GFP-PKD1wt<sup>+</sup> recorren distancias de entre 20-30µm (Fig. R33A, panel inferior). Muy similar fue el resultado obtenido en los experimentos realizados a mayores concentraciones de Fn (Fig. 33B, panel inferior).

Los resultados de los distintos experimentos de video-microscopía demuestran que PKD promueve la motilidad, aumentando la velocidad de desplazamiento sobre Fn en linfocitos T polarizados.

Estos últimos datos sugieren que las causas de la disminución de la migración en los ensayos en *transwell* de células expresando PKD, deben ser forzosamente otras no relacionadas con una inhibición de la motilidad celular. La mayor agregación promovida por PKD podría ser la causa de este fenómeno. No olvidemos que en los ensayos de migración las células son sembradas a altas concentraciones (5x10<sup>6</sup> células/ml) en la cámara superior y que, como hemos demostrado anteriormente (Fig. R25), incluso a concentraciones menores (2x10<sup>6</sup> células/ml) PKD afecta a la adhesión célula-célula. Este aumento en la adhesividad de las células, si bien es probable que no de lugar a grandes agregados en tiempos tan cortos como los utilizados en los ensayos de migración, si puede

dificultar el proceso de extravasación a través de los poros de las cámaras superiores provocando la disminución de la migración observada al sobreexpresar las versiones silvestre y constitutivamente activa de PKD.

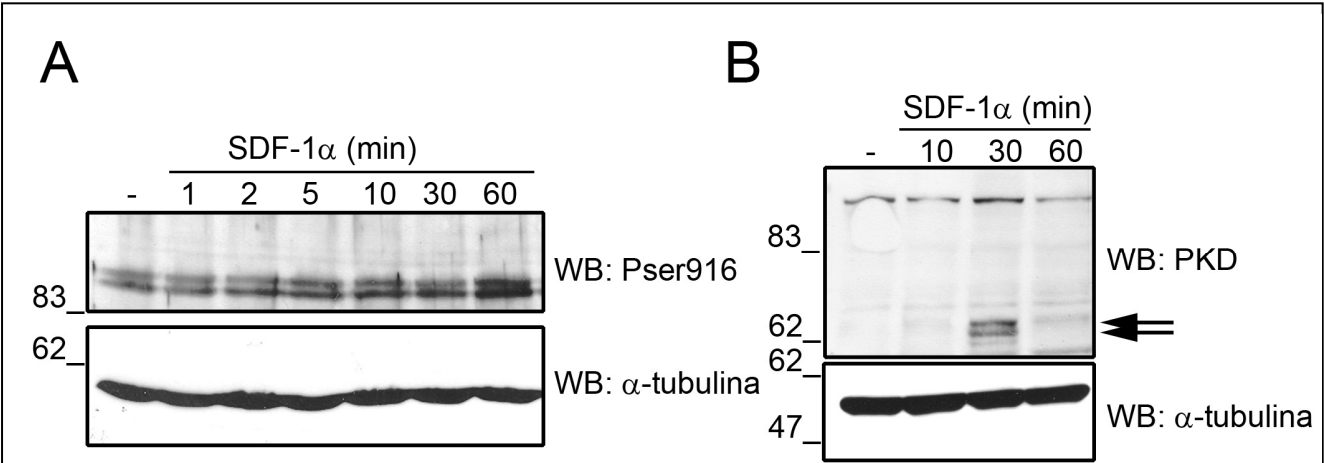
### R17.3- SDF-1 $\alpha$ promueve la fosforilación de PKD

Los resultados expuestos en el apartado R17.1, en los que se muestra un aumento en el índice quimiotáctico en respuesta a SDF-1 $\alpha$  dependiente de la actividad de PKD, son la primera evidencia de que la actividad de esta quinasa está relacionada con respuestas quimiotácticas en linfocitos T.

Sin embargo, se ha descrito que el uso de inhibidores de las vías de PKC bloquea la locomoción inducida por SDF-1 $\alpha$  en linfocitos T<sup>(57)</sup> y PKD es un conocido efector de dichas vías. A su vez, un estudio reciente realizado en células Jurkat ha implicado a PKD en la activación y la translocación a la membrana plasmática de la GTPasa Rap1<sup>(176)</sup>, cuya implicación en la migración de los linfocitos en respuesta a SDF-1 $\alpha$  ha sido demostrada en diversos estudios<sup>(175, 244)</sup>. Estos trabajos han demostrado que Rap1 se activa

transitoriamente en respuesta a SDF-1 $\alpha$ <sup>(175, 244)</sup>, y que el bloqueo de la activación de Rap1 reduce significativamente la habilidad de los linfocitos B para migrar hacia SDF-1 $\alpha$ <sup>(175)</sup> mientras que la sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo de Rap1 favorece la migración trans-endotelial de los linfocitos<sup>(244)</sup>.

El efecto observado en la quimiotaxis frente a SDF-1 $\alpha$  en la línea de linfocitos T Peer expresando las versiones silvestre y constitutivamente activa de PKD, nos llevó a estudiar si dicha quimioquina era capaz de promover la activación de PKD. Para ello llevamos a cabo estimulaciones a distintos tiempos con SDF-1 $\alpha$  de las células Peer, para posteriormente analizar por WB la presencia de PKD fosforilada/activa con el Ac fosfoespecífico. Los tratamientos con SDF-1 $\alpha$  inducían un aumento ligero pero progresivo de la fosforilación en la Ser916 de PKD que era bastante significativo tras 1h de estimulación (Fig. R34A). Por otro lado, utilizando el Ac anti-PKD observamos la aparición de una banda de menor peso molecular a los 30min de tratamiento con SDF-1 $\alpha$  (Fig. R34B). Este dato abre la interesante posibilidad de que la actividad



**Figura R34. Los tratamientos con SDF-1 $\alpha$  promueven la fosforilación de PKD**

**A-** Células Peer fueron resuspendidas en RPMI con 0,1% de BSA y estimuladas durante distintos tiempos (1, 2, 5, 10, 30 y 60min) con SDF-1 $\alpha$  (10ng/ml) y la presencia de PKD-Pser916 en los lisados fue analizada por WB con anti-Pser916. Se realizó un WB con anti- $\alpha$ -tubulina como control de carga. **B-** Los WB con anti-PKD de lisados de células Peer estimuladas con SDF-1 $\alpha$  durante 30min permitieron observar la aparición de un doblete de menor peso molecular (señalado con flechas). Como en el caso anterior, realizamos un WB con anti- $\alpha$ -tubulina como control de carga.

de esta quinasa esté regulada en estas condiciones por procesamiento proteolítico. No en vano, el fragmento C-terminal observado, de tamaño aproximado a 62KDa, hace suponer que este fragmento de PKD conserve el dominio catalítico entero y carezca de buena parte del dominio regulador auto-inhibitorio.

A día de hoy se conocen dos mecanismos de procesamiento proteolítico de PKD, uno mediado por caspasas <sup>(56, 284)</sup> y el otro por calpaína <sup>(127)</sup> y en ambos casos se libera un fragmento C-terminal constitutivamente activo de tamaño variable que oscila entre los 60 y los 77KDa según la proteína que lo procese y el sitio de corte. Es por lo tanto razonable, pensar que la aparición de este fragmento C-terminal de PKD en respuesta a la estimulación con SDF-1 $\alpha$  durante 30min pueda tener una repercusión en la actividad de la proteína.

### **R18- Estudio de la distribución de PKD en respuesta a la polarización con SDF-1 $\alpha$ en células JHM1-2.2**

Como ya hemos mencionado con anterioridad los linfocitos T se polarizan en respuesta a quimioquinas <sup>(45)</sup>. En el caso de SDF-1 $\alpha$ , un trabajo realizado en linfocitos de sangre periférica demostró que la estimulación con esta quimioquina induce la polarización celular provocando la redistribución de ICAM-3 <sup>(288)</sup>. Dicha inducción de la polarización de ICAM-3 variaba en función de la concentración de

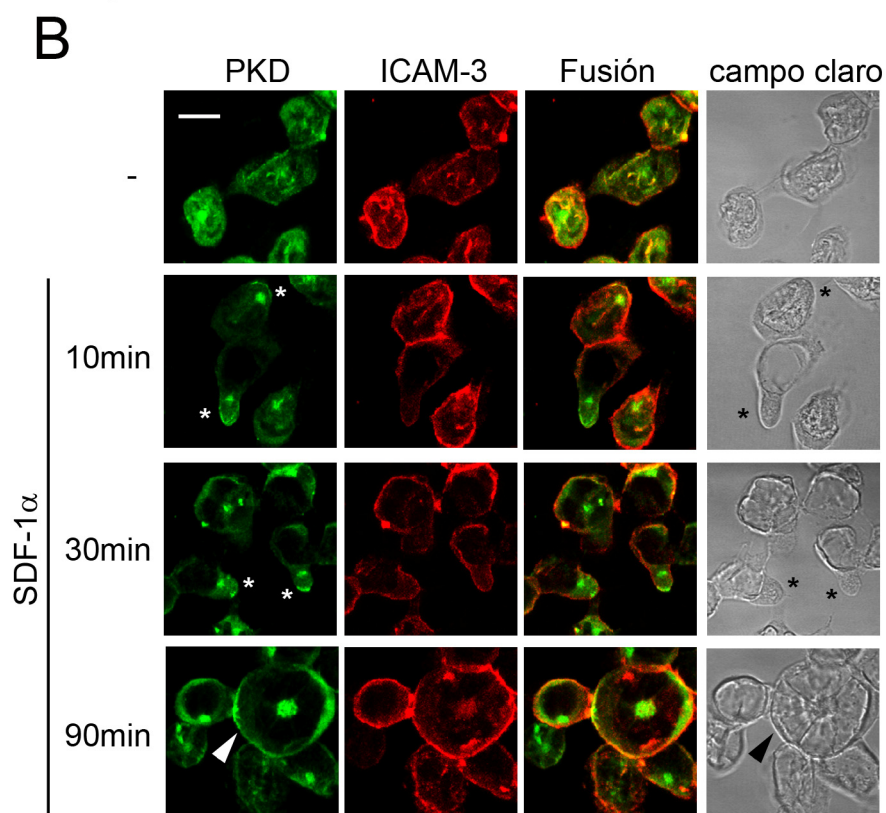
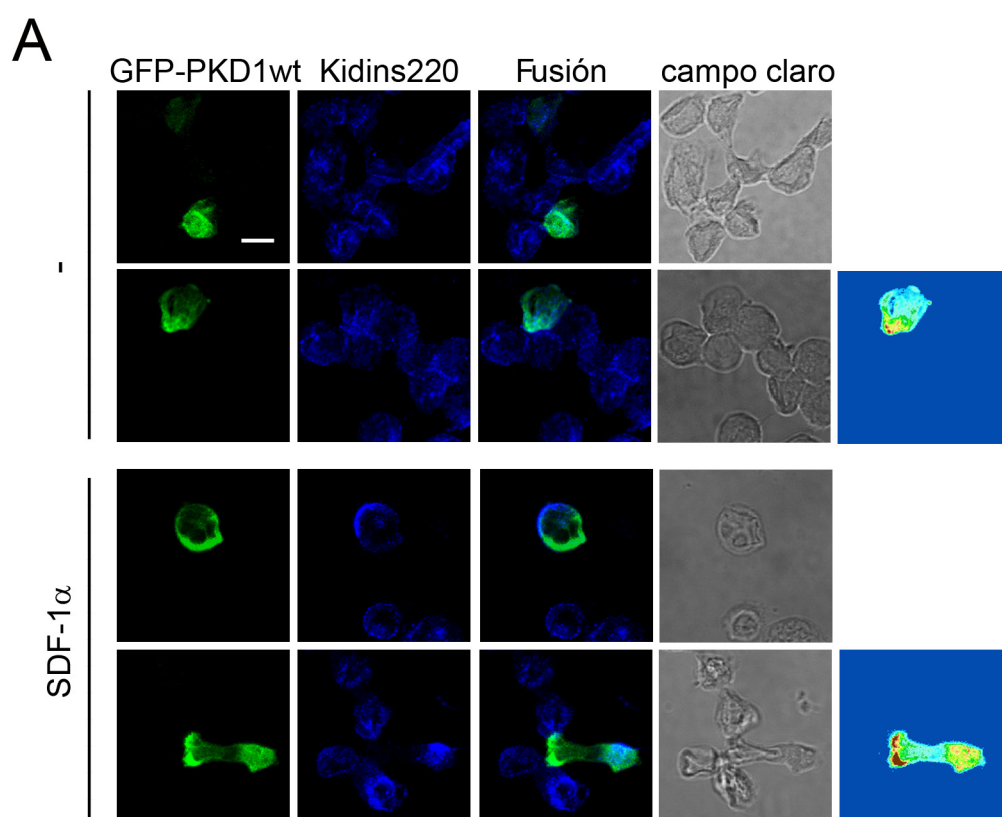
SDF-1 $\alpha$  y del tiempo del estímulo, alcanzando un máximo a los 30min de estimulación con 10nM de SDF-1 $\alpha$ . En estas condiciones, un 20% de la población celular presentaba ICAM-3 polarizado.

Decidimos por tanto estudiar el efecto de la polarización inducida por SDF-1 $\alpha$  en la distribución de PKD. Para ello, y tras descartar el uso de las células Peer por presentar estas una morfología constitutivamente polarizada, decidimos utilizar la línea de linfocitos T no polarizada JHM1-2.2. Mediante inmunofluorescencias de estas células transfectadas con GFP-PKD1wt y teñidas con anti-Kidins220 (Fig. 35A), o doble teñidas con anti-ICAM-3 y anti-PKD, para detectar la proteína endógena en células sin transfectar (Fig.35B), analizamos la localización de PKD en células sin estimular o estimuladas con SDF-1 $\alpha$ .

De forma similar a lo previamente descrito para los linfocitos T de sangre periférica, solo una pequeña proporción de las células JHM1-2.2 adquirirían una morfología polarizada en presencia de SDF-1 $\alpha$ . En este modelo celular, la polarización de las células redistribuía la proteína de fusión GFP-PKD1wt al polo opuesto a donde se encontraba Kidins220 (Fig. R35A). Adicionalmente, los tratamientos con SDF-1 $\alpha$  promovían la concentración de la proteína de fusión en el extremo de las prolongaciones celulares que establecen contactos con las células vecinas (Fig. R35A, panel inferior).

#### **Figura R35. Efecto de la polarización inducida por SDF-1 $\alpha$ en la distribución de PKD en la línea celular JHM1-2.2**

**A-** Las células JHM1-2.2 transfectadas con GFP-PKD1wt fueron resuspendidas en RPMI con 0,1% de BSA y sembradas sobre cubreobjetos con Fn (25 $\mu$ g/ml) y estimuladas o no (-) durante 30min con SDF-1 $\alpha$  (10ng/ml). Tras la fijación, las muestras fueron teñidas con anti-Kidins220 (rojo). Las imágenes de microscopía confocal corresponden a la proyección máxima de una serie completa de secciones. Barra de escala: 8 $\mu$ m. Con el fin de resaltar la distribución de la proteína de fusión en los contactos intercelulares se muestran también un par de paneles con colores artificiales representativos de la intensidad de la fluorescencia GFP. **B-** Las células JHM1-2.2 fueron resuspendidas en RPMI con 0,1% de BSA y sembradas sobre cubreobjetos con Fn (25 $\mu$ g/ml) y estimuladas o no (-) durante distintos tiempos (10min, 30min, 90min) con SDF-1 $\alpha$  (10ng/ml). Tras la fijación, se realizaron inmunofluorescencias dobles con anti-ICAM-3 y anti-PKD. Las imágenes de microscopía confocal corresponden a la proyección máxima de una serie completa de secciones. El urópodo de las células polarizadas viene señalado con un asterisco. El grupo de células agregadas viene señalado as su vez con una punta de flecha. Barra de escala: 8 $\mu$ m.



Por otro lado, las tinciones con el Ac anti-PKD corroboraron la polarización de PKD endógena al estimular las células JHM1-2.2 con SDF-1 $\alpha$ . Así en las

células sin tratar (resuspendidas en medio sin suero) la tinción de PKD revelaba una distribución mayoritariamente citosólica de la proteína. Por el

contrario, a tiempos cortos de tratamiento con SDF-1 $\alpha$  (10-30min) aparecían células con una morfología polarizada en las que PKD se redistribuía en el urópodo, concentrándose de forma significativa en el cuello de esta estructura así como en su parte más distal en las proximidades de la superficie celular (Fig. R35B células marcadas con un asterisco). Curiosamente, en este modelo celular, ICAM-3 no presentaba una redistribución preferencial hacia el urópodo y se puede observar en algunos casos a esta molécula de adhesión en el frente de avance interaccionando con las células vecinas (Fig. R35B).

La formación de agregados compactos de células JHM1-2.2 a tiempos largos de estimulación con SDF-1 $\alpha$  (Fig. R35B 90min, señalado con puntas de flecha) provocaba la re-localización de PKD al centro de estos. Esta distribución era muy similar a la observada en esta misma línea celular tras el tratamiento con HP2/19 (Fig. R26). A su vez, a tiempos largos de estimulación con SDF-1 $\alpha$ , PKD estaba presente en la membrana plasmática de forma muy significativa, poniendo de manifiesto que en respuesta a esta quimioquina PKD sufre también una translocación a la superficie celular.

Estos resultados demuestran claramente que la polarización celular inducida por SDF-1 $\alpha$  en células JHM1-2.2 redistribuye a PKD al urópodo de dichas células. A su vez la presencia de GFP-PKD1wt en los extremos de las prolongaciones celulares que contactan con las células vecinas, así como la re-localización de la proteína endógena al centro de los agregados promovidos por los tratamientos con SDF-1 $\alpha$ , pueden ser indicios de la participación de PKD en los procesos de adhesión intercelular inducidos por SDF-1 $\alpha$ .



## DISCUSIÓN





## D1- Kidins220; un nuevo componente estructural del urópodo embebido en balsas lipídicas

Kidins220 es una proteína integral de membrana recientemente identificada en células de origen nervioso donde presenta una distribución polarizada, acumulándose en el cono de crecimiento axonal y en los puntas de las extensiones neuríticas<sup>(28, 107, 132)</sup>. En esta tesis hemos demostrado por RT-PCR y por WB que los linfocitos T expresan Kidins220, si bien los niveles de expresión de la proteína son significativamente menores a los observados en células neurales (Fig. R1). Este dato está en connivencia con los resultados de trabajos anteriores que destacan una elevada expresión de Kidins220 en cerebro y sistema nervioso<sup>(107, 132)</sup>.

Mediante microscopía confocal hemos demostrado que la localización celular de Kidins220 depende del grado de polarización de las células (Fig. R2). En linfoblastos T esféricos y en líneas celulares no polarizadas, Kidins220 presenta una distribución homogénea a lo largo de la membrana plasmática, mientras que en células T polarizadas Kidins220 se concentra de forma casi exclusiva en la protuberancia trasera de las células (Fig. R2), co-localizando con distintos marcadores de urópodo: ICAM-3, CD43 y CD44 (Fig. R3). En el contexto del sistema inmune, se ha demostrado la presencia de Kidins220 en células dendríticas inmaduras donde también presenta una distribución polarizada<sup>(221)</sup>. Sin embargo, a diferencia de lo que hemos observado en linfocitos T, en las células dendríticas inmaduras Kidins220 se concentra principalmente en el frente de avance. A pesar de ello, y de forma significativa, Kidins220 también co-localiza con ICAM-3, CD43 y CD44 en estas células<sup>(221)</sup>. Estos resultados sugieren que estas proteínas pueden redistribuirse a uno u otro polo de las células confiriendo determinadas características funcionales a dichas regiones dependiendo del estado de activación y del papel jugado por los diferentes tipos de leucocitos.

A su vez, estos datos también apuntan a la posible implicación de Kidins220 en las funciones ejercidas por estas moléculas de adhesión, evidenciando el posible papel de Kidins220 en las interacciones celulares. Los estudios de microscopía confocal que muestran a Kidins220 en las zonas de interacción célula-célula refuerzan esta idea (Figs. R2 y R11).

La integridad de las balsas lipídicas o *lipid rafts* es esencial para la generación y el mantenimiento de la polaridad morfológica, bioquímica y funcional de los linfocitos T<sup>(81, 82, 158, 180)</sup>. Se han descrito dos tipos diferentes de balsas lipídicas enriquecidas en los gangliósidos GM1 o GM3, localizados en el urópodo y en el frente de avance de los linfocitos T, respectivamente<sup>(81, 82)</sup>. Consistente con la distribución diferencial de Kidins220 en el urópodo de las células T polarizadas, hemos detectado mediante microscopía confocal que nuestra proteína está presente en microdominios ricos en GM1 (Fig. R4A). También hemos determinado mediante fraccionamiento en gradientes de flotación que una fracción importante de dicha proteína está embebida en balsas lipídicas (Fig. R6B). Este resultado es similar al que observamos en células dendríticas inmaduras<sup>(221)</sup>.

Agentes secuestradores de colesterol (como la MCDX) que desorganizan estas balsas lipídicas han sido ampliamente utilizados para determinar las funciones así como las vías de transducción de señales mediadas por los *lipid rafts* en los linfocitos T<sup>(5, 81, 104, 120, 163, 180)</sup>. El tratamiento con MCDX provoca la pérdida de polaridad de la línea celular Peer, redistribuyendo Kidins220 a lo largo de la membrana plasmática (Fig. R4B). Estos datos demuestran la importancia de la integridad de estos microdominios para el mantenimiento de la localización de Kidins220 en el urópodo, al igual que lo es para la polaridad de otros componentes de dicha estructura protuberante como ICAM-3<sup>(180)</sup> o CD44<sup>(81)</sup> en linfocitos T. Trabajos previos de nuestro laboratorio han determinado, a su vez, la importancia de la integridad de las balsas lipídicas en la localización de Kidins220 en estos

microdominios en células PC12 y neuronas corticales <sup>(28)</sup>, así como en células dendríticas <sup>(221)</sup>. En todos los casos la desorganización de los *lipid rafts* al tratar con MCDX afecta gravemente a la distribución celular de Kidins220.

Las balsas lipídicas están normalmente dispersas por la membrana y su reorganización requiere de una maquinaria especializada que permite que dichos microdominios sean operativos. De hecho, la activación de los linfocitos T induce una rápida reorganización de dichas balsas lipídicas que actúan como plataformas de ensamblaje de las maquinarias de señalización mediando su compartimentalización en distintos polos de la célula <sup>(5)</sup>.

Caveolina-1 pertenece a una familia de proteínas involucradas en la formación de un tipo específico de microdominios lipídicos denominado caveolas. Esta proteína participa en la reorganización de dichos microdominios en otros tipos celulares como las células epiteliales polarizadas, donde median la señalización y el transporte intracelular. Caveolina-1 se expresa en numerosos tipos celulares, sin embargo su presencia en linfocitos hasta la fecha ha sido motivo de controversia. Diversos trabajos realizados por la Dra. A.M. Fra y cols. demostraron que los linfocitos carecen de caveolas, microdominios lipídicos típicos organizados por caveolina <sup>(69)</sup>, y determinaron la ausencia de expresión de caveolina tanto a nivel de proteína como de ARNm en preparaciones de leucocitos <sup>(67)</sup> así como en distintas líneas celulares linfoides <sup>(69)</sup>. La demostración posterior de que la expresión ectópica de caveolina-1 en linfocitos T era suficiente para dar lugar a la formación de caveolas <sup>(68)</sup>, llevó a concluir que la ausencia de dichas estructuras en leucocitos era consecuencia de la falta de expresión de caveolina. Esta última aseveración paso a ser un hecho ampliamente aceptado <sup>(5, 203)</sup>. Sin embargo, otros autores han sugerido que caveolina se encuentra presente en células de origen linfóide y que su expresión y distribución dependerían del grado de activación y/o maduración de las células <sup>(90)</sup>. Así

diversos trabajos han detectado la proteína caveolina-1 en linfocitos bovinos <sup>(91)</sup>, así como en una línea linfocitaria derivada de Jurkat y en distintas líneas de células T derivadas de leucemias humanas <sup>(92, 278)</sup>. En este último caso, la presencia de caveolina-1 correlacionaba con un alto grado de activación de las células, indicando que su expresión podría inducirse según el estado de activación celular <sup>(92, 278)</sup>.

En esta tesis, demostramos por primera vez mediante RT-PCR y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados, que tanto los linfoblastos T primarios como la línea celular derivada de Jurkat JHM1-2.2 y las células Peer expresan los transcritos de caveolina-1 (Fig. R5A). También detectamos la proteína mediante ensayos de WB (Fig. R5B). Los niveles de caveolina-1 son curiosamente más altos en la línea celular constitutivamente polarizada Peer que en linfoblastos o en la línea JHM1-2.2 no polarizada. Adicionalmente, hemos podido comprobar bioquímicamente que caveolina-1 está presente en *lipids rafts* y que interacciona con Kidins220 en células Peer (Fig. R6A y B). Durante la escritura de esta tesis, un nuevo trabajo del grupo del Dr. A. Shimizu, muestra que varias líneas de células T derivadas de leucemias humanas expresan caveolina-1 y 2 a nivel de ARNm, apoyando los datos presentados en esta tesis <sup>(279)</sup>.

## **D2- La polaridad celular modula la interacción entre Kidins220 e ICAM-3; implicación de las vías de PKC**

Hemos demostrado que Kidins220 interacciona con ICAM-3 y con las proteínas ERM (Fig. R7). La relación entre las moléculas de adhesión transmembranales y el CK de actina es vital para distintos procesos esenciales en la biología de los leucocitos como son la polarización y generación de estructuras protuberantes, la interacción célula-célula y la migración. Las proteínas ERM son moléculas puente entre la membrana plasmática y el CK que juegan un papel clave en la re-localización de las proteínas de adhesión de membrana durante el proceso de formación del

urópodo <sup>(35, 113, 289)</sup>. Pueden asociarse a F-actina a través de su dominio C-terminal y a diversas proteínas de membrana tales como PSGL-1, CD43, CD44, ICAM-1, -2 y -3 a través de su dominio FERM N-terminal <sup>(4, 99, 237, 305)</sup>. Un pormenorizado estudio llevado a cabo por el Dr. Hamada y cols. demostró la existencia de un motivo de unión a FERM en la zona yuxta-membrana de la cola citoplasmática de ICAMs, CD44 y CD43 <sup>(87)</sup>. Sin embargo, no hemos podido identificar dicho motivo en la secuencia de Kidins220, lo que sugiere la posible participación de otros dominios en la interacción con las proteínas ERM en caso de que se tratase de una interacción directa. Una posibilidad alternativa consistiría en la asociación indirecta de Kidins220 con estas proteínas a través de la proteína PDZ, NERF/EBP50. Esta última ha sido ampliamente descrita como un adaptador capaz de unirse al dominio FERM de las ERM y servir de puente entre estas y diversas proteínas de la membrana <sup>(113, 214)</sup>. Esta hipótesis se ve avalada por el hecho de que el extremo C-terminal de Kidins220 constituye un motivo de unión a dominios PDZ de tipo I <sup>(154, 233)</sup>. Con el fin de estudiar la posible interacción directa entre ICAM-3 y Kidins220 se llevaron a cabo ensayos de *pull-down* con el fragmento citoplasmático de ICAM-3 comprobándose la incapacidad de dicho fragmento para interactuar con Kidins220. Este dato sugiere que la interacción entre ambas proteínas podría no ser directa. Sin embargo, no podemos descartar que estas dos moléculas interactúen a través de sus dominios transmembrana. Se ha descrito que la interacción de Kidins220 con los receptores de neurotrofinas Trk está mediada por dichos dominios <sup>(9)</sup>. Curiosamente, tanto los receptores Trk como ICAM-3, pertenecen a la superfamilia de las Ig y presentan una sola hélice transmembrana. Por tanto, sería factible que la interacción entre ICAM-3 y Kidins220 ocurriera de un modo similar. Esta posibilidad no ha podido ser comprobada debido a la insolubilidad de la proteína de fusión a GST que comprende el fragmento transmembrana de ICAM-3. Otra opción factible es

que la familia de proteínas ERM estuviera mediando la asociación de ICAM-3 con Kidins220 en linfocitos T polarizados.

La asociación de ICAM-3 con Kidins220 depende de la polaridad celular. Este hecho lo hemos podido comprobar inicialmente en los inmunoprecipitados de ICAM-3 de células T no polarizadas como JHM1-2.2 (Fig. R7A). A su vez en la línea celular Peer, estímulos despolarizantes, como la Cit.D o los é.f, también provocan la pérdida parcial de la interacción entre estas dos proteínas y su redistribución fuera del urópodo (Figs. R8 y R9).

Trabajos previos ya habían demostrado que los tratamientos con é.f promueven la distribución uniforme de ICAM-3 a lo largo de la membrana plasmática de los linfocitos T <sup>(30)</sup>.

Aquí probamos que, el pre-tratamiento con el inhibidor de PKC GF-1 previene la redistribución de ICAM-3 y Kidins220 fuera del urópodo y su consiguiente disociación inducida por PDBu. Este último resultado demuestra la implicación de las vías de PKC en la regulación de la localización e interacción de Kidins220 e ICAM-3 en células T polarizadas.

Los é.f promueven la fosforilación de Kidins220 <sup>(107)</sup> y también inducen la fosforilación del dominio citoplásmico de ICAM-3 <sup>(98)</sup>. Adicionalmente, se ha demostrado la importancia de varias serinas de este dominio citoplásmico susceptibles de fosforilarse en la unión de ICAM-3 a las proteínas ERM y la consiguiente distribución de esta molécula de adhesión en el urópodo de los linfocitos T <sup>(240)</sup>. Los resultados obtenidos en esta tesis permiten plantear un posible modelo en el que diversas fosforilaciones dependientes de la activación de las vías de PKC regulen la disociación de los complejos formados por ICAM-3, Kidins220 y las proteínas ERM en las células T polarizadas, afectando así a la polaridad de estas moléculas y de las células. Esta posibilidad volverá a ser discutida en mayor profundidad más adelante.

### **D3- Kidins220, un buen candidato a participar en la polaridad celular**

Las moléculas de adhesión agrupadas en el urópodo, ICAM-3 entre ellas, presentan por lo general unas colas citoplasmáticas bastante cortas. Por el contrario, Kidins220 cuenta con un enorme dominio citoplasmático que contiene multitud de motivos de interacción entre proteínas <sup>(107)</sup>. Por lo tanto, Kidins220 podría jugar un importante papel como plataforma de reclutamiento para distintas moléculas implicadas en vías de señalización o en el mantenimiento de la estructura del urópodo, regulando así la polaridad celular. El grupo del Dr. M.V. Chao ha empleado la región transmembrana de Kidins220 como un dominante negativo, observando que dicho fragmento disminuye la interacción de Kidins220 con los receptores Trk, alterando la señalización en respuesta a neurotrofinas en neuronas. Estos datos han permitido establecer la participación de Kidins220 en las vías de señalización de estos factores tróficos <sup>(9)</sup>.

Suponiendo que la interacción de Kidins220 con ICAM-3 tuviese lugar de forma análoga al caso de Trk, sería enormemente interesante poder expresar dicho dominio transmembrana en distintas líneas de linfocitos T, tanto constitutivamente polarizados como sin polarizar, para así poder establecer el efecto de la interacción de Kidins220 con ICAM-3 en la distribución polarizada de esta molécula de adhesión en los linfocitos T. Desgraciadamente, la transfección de dicha construcción en la línea de linfocitos T polarizados Peer no ha dado lugar a niveles detectables de la proteína recombinante, lo que ha impedido llevar a cabo dichos estudios.

Se ha publicado recientemente que una red de proteínas PDZ están implicadas en el establecimiento de la polaridad de los linfocitos T <sup>(149)</sup>. Por otro lado, Kidins220 presenta un motivo de unión a dominios PDZ en su extremo C-terminal que juega un papel crucial en la distribución y transporte de la proteína <sup>(154, 233)</sup>. Estas premisas nos llevaron a estudiar la posible implicación de dicho extremo C-terminal en la

distribución polarizada de Kidins220 e ICAM-3. Decidimos utilizar la construcción GFP-Kidins1340, como un posible competidor de las interacciones que establece esta región de la proteína endógena, y muy particularmente su sitio de unión a proteínas PDZ, con otras proteínas. Hemos observado que la expresión de esta proteína no afecta a la localización polarizada de ICAM-3 en células Peer (Fig. R10A), si bien este abordaje no nos permite descartar la posible implicación de Kidins220 en el establecimiento y/o mantenimiento de la polaridad de las células. Esta aproximación, sin embargo, nos permitió comprobar que la cola C-terminal de Kidins220 es importante para su distribución celular puesto que la proteína GFP-Kidins1340, aunque soluble, presenta una distribución polarizada en la mayoría de la población celular transfectada (Fig. R10B). Estos resultados sugieren que para que Kidins220 se retenga en el urópodo necesita otras secuencias que no están en este último exón codificante. Por otro lado, cabe preguntarse qué función juegan las proteínas PDZ en la localización subcelular de Kidins220, y si existen distintas proteínas PDZs encargadas de agrupar a nuestra molécula en uno u otro polo de la célula.

### **D4- Kidins220, un buen candidato como regulador de los procesos de adhesión intercelular en leucocitos**

Kidins220 se encuentra enriquecido en las zonas de contacto célula-célula en las adhesiones entre linfocitos T (Figs. R2 y R11A). A su vez, los resultados obtenidos con el Ac Tmb han demostrado su implicación en la adhesión homotípica de linfocitos T polarizados inducida por é.f (Fig. R11C). Quedan por esclarecer los mecanismos mediante los cuales dicho Ac es capaz de regular fenómenos de adhesión homotípica, así como identificar el papel exacto desempeñado por Kidins220 en dicho proceso. Sin embargo, existen otras evidencias que señalan a Kidins220 como un probable actor principal en los mecanismos reguladores de la adhesión leucocitaria. Su fosforilación por PKD en respuesta a

é.f lo sitúan como un posible efector de las vías de PKC. Estas últimas han sido ampliamente descritas como reguladoras de los reordenamientos citoesqueléticos que modulan procesos de adhesión mediados por integrinas. En connivencia con esto último, Kidins220 presenta numerosos módulos susceptibles de interactuar con múltiples componentes del CK.

En esta tesis, demostramos la participación de PKD tanto en la fosforilación como en la señalización de ICAM-3 (Figs. R20 y R25-27). Con anterioridad habíamos demostrado que Kidins220 es sustrato de PKD<sup>(107)</sup> y aquí mostramos que se asocia fuertemente con ICAM-3. Por otro lado, se sabe que la estimulación de ICAM-3 promueve la activación de tirosín quinasas que fosforilan numerosas proteínas concentradas en las zonas de interacción célula-célula<sup>(11, 249)</sup>. Todos estos datos unidos al hecho de que Kidins220 presenta numerosos residuos de tirosina susceptibles de fosforilarse en respuesta a diversos estímulos<sup>(8, 9, 132)</sup>, permiten sugerir que Kidins220 participe en las vías de señalización de ICAM-3, estando así implicado en la regulación de las adhesiones intercelulares.

## **D5- La participación de Kidins220 en la quimiotaxis promovida por SDF-1 $\alpha$ .**

El uso del Ac generado contra los lazos extracelulares de Kidins220 induce una significativa disminución de la migración en respuesta a SDF-1 $\alpha$  (Fig. R12). Este resultado apunta a una participación de Kidins220 en las vías de señalización que median la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$  en la línea de linfocitos Peer.

Varios trabajos han demostrado la participación de Kidins220 en la señalización mediada por efrinas, demostrando tanto su fosforilación en respuesta a estimulación con efrina-B2<sup>(132)</sup> como su implicación en la fosforilación del receptor EphA4 inducida por la efrina-A1<sup>(154)</sup>. A su vez, dos estudios recientes han demostrado la implicación de varias efrinas, destacando principalmente la efrina-A1, en la modulación de la quimiotaxis de los linfocitos T en respuesta a SDF-1 $\alpha$

<sup>(1, 242)</sup>. Sin embargo los resultados obtenidos en estas dos investigaciones han sido diametralmente opuestos. Así el primero de demuestra que la migración en respuesta a SDF-1 $\alpha$  disminuye drásticamente en presencia de diversas efrinas (efrinas-A1,-A3 y -B2 principalmente) tanto en timocitos, como en linfocitos de sangre periférica y en la línea de células T Jurkat. Por el contrario, el segundo trabajo, realizado por Dr. H.C. Aasheim y cols. estableció que la presencia de efrina-A1 inducía un fuerte aumento de la migración en repuesta a SDF-1 $\alpha$  en los linfocitos T CD4+. Sin embargo, ambos trabajos han destacado la participación de cascadas de tirosín quinasas y de diversas proteínas involucradas en las remodelaciones del CK como Pyk2<sup>(1)</sup>, Cdc42 y Rho<sup>(242)</sup>. De forma interesante, los dos estudios aunque con resultados opuestos han relacionado los efectos promovidos en la quimiotaxis en repuesta a SDF-1 $\alpha$  por las efrinas con la regulación de los procesos de polimerización de actina por estas últimas<sup>(1, 242)</sup>. La participación de Kidins220 en las vías de señalización de los receptores de efrinas, así como la presencia de numerosas repeticiones de ankirina susceptibles de asociar esta proteína al CK, permiten especular acerca de su posible implicación en la remodelación del CK promovida en la quimiotaxis por SDF-1 $\alpha$ .

Una explicación alternativa al papel ejercido por Kidins220 sobre la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$  es la posible implicación de esta proteína en los procesos de internalización de su receptor CXCR4. Durante años se ha asumido de forma general que la internalización de los CKR en respuesta a la estimulación con quimioquinas es un mecanismo de desensibilización, similar al de otros GPCR. Dicho proceso se encarga de la finalización de la señal, pudiendo conducir al receptor a la degradación lisosomal o al reciclaje tras su resensitización. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado para distintos receptores que si bien la internalización afecta a determinadas vías de señalización, otras vías por el contrario no se ven alteradas por este proceso. Cabe

destacar en este contexto que la internalización y el reciclaje continuo de CKR a la membrana plasmática es esencial en muchos casos para la respuesta frente a estímulos quimiotácticos<sup>(190)</sup>. Así, la importancia de la internalización de CXCR4 en la quimiotaxis inducida por SDF-1 $\alpha$  ha sido puesta de manifiesto en distintos trabajos<sup>(50, 153)</sup>. Datos aún no publicados en el laboratorio han demostrado la interacción de Kidins220 con cortactina (A.Higuero y T.Iglesias), proteína asociada a actina y endosomas que participa en la endocitosis mediada por clatrina del receptor CXCR4 tras la estimulación de las células con SDF-1 $\alpha$ <sup>(153)</sup>. Significativamente, el bloqueo de la expresión de cortactina mediante ensayos de ARNi provoca una severa reducción de la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$ <sup>(153)</sup>, resultado similar al que hemos encontrado al pretratar las células Peer con el Ac anti-Tmb de Kidins220 (Fig. R12).

Aunque la ruta principal de endocitosis y tráfico vesicular de los CKR es la que viene mediada por clatrina, diversos trabajos han determinado que la internalización de estos CKR también puede tener lugar por mecanismos distintos mediados por balsas lipídicas o caveolas<sup>(190)</sup>. Este tráfico dependiente de *lipid rafts* podría estar mediando la endocitosis de CXCR4. Aunque algunos autores postulan que solo CCR5 y no CXCR4 se asocia y endocita por vías mediadas por caveolinas<sup>(286)</sup>, otros han demostrado que la extracción de colesterol con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina inhibe la internalización de CXCR4 en linfocitos T<sup>(192)</sup>. Por otro lado, la inhibición de la relocalización en el frente de avance de CXCR4 y de la migración en respuesta a SDF-1 $\alpha$  de los linfocitos T provocada por la depleción de colesterol ha dejado patente la importancia de las balsas lipídicas en la quimiotaxis frente a SDF-1 $\alpha$ <sup>(281)</sup>. Un estudio realizado en astrocitos ha demostrado que la mera supresión de la expresión de caveolina-1 produce idénticos efectos en la quimiotaxis en respuesta CCL2 al inhibir la internalización de su receptor<sup>(77)</sup>. Estos hechos unidos a resultados obtenidos en esta tesis que demuestran la

expresión de caveolina-1 en linfocitos T y su interacción y co-distribución en balsas lipídicas con Kidins220 abren la posibilidad de que estas dos proteínas puedan estar implicadas en los procesos de internalización y reciclaje del receptor CXCR4 participando de esta forma en la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$ .

## **D6- La relación SDF-1 $\alpha$ -Kidins220 y el posible paralelismo con su función en el sistema nervioso y la activación de los linfocitos T**

La migración celular es un proceso crucial tanto en el tráfico leucocitario y la tumorigénesis en individuos adultos, como en cardiogénesis y en la formación del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario. Las moléculas implicadas en la guía direccional de estos procesos son fundamentales y numerosos estudios han demostrado su conservación en los distintos sistemas<sup>(212)</sup>.

En los últimos años diversos trabajos han demostrado la interrelación entre la señalización mediada por efrinas y la inducida por SDF-1 $\alpha$  tanto en la migración de neuronas granulares del cerebelo<sup>(148)</sup>, como en la regulación del movimiento de las células endoteliales<sup>(230)</sup> y la migración leucocitaria<sup>(1, 242)</sup>. Los datos aportados en esta tesis sumados a estos resultados podrían poner de manifiesto la participación de Kidins220 como un modulador común de los efectos mediados por SDF-1 $\alpha$  y las efrinas, pudiendo jugar un importante papel en la integración intracelular de ambas señales tanto en el control del tráfico leucocitario, como en los procesos de migración neuronal o endotelial durante el desarrollo embrionario.

Por último, es importante destacar una serie de hechos que permiten plantear la interesante hipótesis acerca de la posible implicación de Kidins220 en el establecimiento inicial de la respuesta inmune. En primer lugar, Kidins220 participa en las vías de señalización de efrinas y SDF-1 $\alpha$ . A su vez estas vías



están relacionadas con la regulación del CK de actina en el frente de avance y participan como co-receptores del TCR. Además por otro lado, Kidins220 se localiza en zonas de interacción celular y presenta numerosos módulos de interacción con proteínas del CK de actina. Finalmente, Kidins220 interacciona con ICAM-3, cuya implicación en el establecimiento de contactos iniciales célula T- APC ha sido sobradamente demostrada <sup>(185)</sup>.

La transfección de oligonucleótidos de ARNi no ha sido capaz de disminuir los niveles de Kidins220 en este sistema celular. Este hecho nos ha conducido a desarrollar nuevos abordajes para tratar de conseguir el silenciamiento de la expresión de Kidins220. En la actualidad estamos clonando shARN en vectores lentivirales con el fin de seguir esclareciendo el papel de Kidins220 en la adhesión celular, la participación en las vías de señalización de ICAM-3 y la quimiotaxis en linfocitos T polarizados.

## **D7- PKD, una quinasa enriquecida en el urópodo que se asocia y fosforila a ICAM-3**

En la línea de linfocitos T constitutivamente polarizados Peer, PKD se encuentra parcialmente enriquecida en el urópodo (Fig. R14A). Además PKD interacciona con varios componentes de esta estructura entre los cuales se encuentran las proteínas transmembranales Kidins220, conocido sustrato de esta quinasa <sup>(107)</sup> e ICAM-3 (Figs. R13 y R14), así como la familia de proteínas ERM (Figs. R19).

Centrándonos en la interacción de PKD con la molécula de adhesión ICAM-3 hemos podido comprobar mediante diversos ensayos (IVK, WB) que la despolarización inducida por é.f disminuye la interacción de PKD con ICAM-3 tanto a nivel de proteína total (Fig. R16A) como de la fracción activa fosforilada de la quinasa (Fig. R16B y R17).

Inmunofluorescencias obtenidas tras el pre-tratamiento con el inhibidor de PKC, GF-I (Fig. R9 y R17) demuestran que la despolarización celular promovida por los é.f depende de las vías de PKC. Más aún,

dichas vías modulan la interacción de PKD con ICAM-3 (Fig. R16), así como la interacción de esta última con las proteínas ERM (Fig. R18).

La aparición de una banda de menor movilidad electroforética, y probablemente hiperfosforilada, de las proteínas ERM tras el tratamiento con PDBu (Fig. R18), concuerda con los datos obtenidos previamente en otros trabajos que han señalado a PKC $\theta$  y PKC $\alpha$  como quinasas susceptibles de fosforilar a moesina y ezrina respectivamente <sup>(191, 208)</sup>. Estos estudios demostraron que ambas PKCs fosforilan la treonina del dominio C-terminal de las proteínas ERM, una fosforilación que rompe la conformación inactiva de estas últimas incrementando la interacción de estas proteínas con la red de F-actina cortical <sup>(248)</sup>.

La interacción de ICAM-3 con esta fracción hiperfosforilada de las proteínas ERM tras el tratamiento con é.f (Fig. R18) parece indicar la probable participación de estas últimas en la redistribución de ICAM-3 fuera del urópodo mediada por la activación de las vías de PKC (Fig. R9 y R17). Estos datos estarían en connivencia con los obtenidos por el Dr. M.Brown y cols. en un estudio realizado en linfocitos de sangre periférica, que demostró que la polarización inducida por SDF-1 $\alpha$  correlaciona y depende de la rápida defosforilación de proteínas ERM y de su disociación del CK de actina <sup>(24)</sup>.

Diversos estudios sugieren que la activación *in vivo* de las proteínas ERM es provocada en primera instancia por la interacción de estas con polifosfoinosítidos, señalando la fosforilación del dominio C-terminal como un requisito posterior no forzosamente indispensable que estabilizaría esta conformación activa <sup>(165, 306)</sup>. Sin embargo, la correlación del estado de fosforilación de las proteínas ERM con la regulación de la polaridad celular nos llevó a estudiar su posible fosforilación por PKD, ya que en la línea constitutivamente polarizada Peer, PKD interacciona con esta familia de proteínas (Fig. R19A). Los ensayos IVK realizados en presencia de GST-PKD1cat-WT demostraron que esta quinasa es incapaz de fosforilar a

las proteínas ERM *in vitro* (Fig. R19B). Por otro lado, estos ensayos nos han permitido demostrar que la fracción de PKD endógena que interacciona con esta familia de proteínas no se encuentra activa al carecer de la capacidad de auto/transfosforilarse *in vitro* (Fig. R19C).

Estos mismos ensayos IVK sí nos permitieron certificar la fosforilación de ICAM-3 por PKD (Figs. R20). El análisis posterior de la fosforilación de los diversos mutantes puntuales de ICAM-3 S487A, S489A, S496A, S503A y T497A hace pensar que PKD pueda fosforilar varios de estos residuos de la cola citoplasmática de ICAM-3 (Fig. R21B). Por otro lado, la disminución generalizada de la fosforilación en todos los mutantes (salvo en el de S487A) y la cercanía de las distintas serinas y treonina mutadas, hace prever que también existan posibles efectos sobre la fosforilación por impedimentos estéricos o cambios conformacionales.

Las Ser489 y Ser496 parecen buenas candidatas a ser fosforiladas por PKD. Por un lado, su sustitución por alanina disminuye en mayor medida que otros mutantes la fosforilación por la quinasa (Fig. R21B), y por otro, la secuencia que las rodea presenta una alta similitud con las distintas secuencias consenso de fosforilación de PKD propuestas en diversos estudios (Fig. R21C) <sup>(52, 105, 194)</sup>. Ambas serinas tienen una arginina en posición -3, crítica en dicha secuencia. Sin embargo ninguna de las dos presenta la leucina -5 (Fig. R21C), un residuo muy conservado, presente en la inmensa mayoría de los sustratos de PKD y teóricamente solo reemplazable por residuos alifáticos como valina o isoleucina; si bien la lista de sustratos de PKD no es todavía muy amplia, y gran parte de ellos han sido identificados a partir del rastreo de sus secuencias consenso. Así, algunos datos parecen indicar que la posición -5 admite mayor variabilidad que la actualmente establecida. Un caso bastante significativo es el de HDAC7, sustrato que presenta cuatro sitios de fosforilación por PKD, todos ellos distintos entre sí. Curiosamente, la Ser155, cuya fosforilación es la más

crítica para la regulación del exporte núcleo-citoplasmático de la proteína, es la que más difiere de las cuatro en lo que respecta a la secuencia consenso de PKD presentando la arginina -3 en posición -4. Sorprendentemente, la fosforilación *in vitro* de este residuo por PKD sigue presentando la misma eficiencia incluso tras la sustitución de la leucina -5 por una alanina <sup>(48)</sup>. A su vez, el último y minucioso estudio realizado sobre la secuencia consenso de PKD dio origen a un Ac generado contra dicha secuencia que es capaz de reconocer en buena medida algunos péptidos que presentan residuos básicos en posición -5 <sup>(52)</sup>. Cabe, por tanto, la posibilidad de que existan otros sustratos de PKD, como ICAM-3, que no respeten en su totalidad la secuencia consenso para PKD.

Aunque no hemos determinado si PKD fosforila a ICAM-3 *in vivo*, esta posibilidad concordaría sin duda con los datos obtenidos por el Dr. Hayflick y cols. que demostraron la fosforilación de varias serinas de la cola citoplasmática de ICAM-3 tras la estimulación del TCR y en respuesta a é.f <sup>(98)</sup>, dos estímulos que activan y translocan a PKD a la membrana. Más aún, este trabajo identificó a la Ser489 como un sitio de fosforilación *in vivo* y señaló la capacidad de fosforilación *in vitro* de este residuo por extractos celulares de células Jurkat enriquecidos en PKC $\theta$ . Un trabajo posterior en esta misma línea celular demostró que PKD es un efector directo de PKC $\theta$  <sup>(307)</sup>.

La posible fosforilación de las Ser489 y Ser496 por PKD abre la posibilidad de la implicación de esta quinasa en los distintos procesos mediados por ICAM-3. Así el minucioso estudio del dominio citoplasmático de la proteína realizado por el Dr. Hayflick implicó a la Ser489 en diversos efectos promovidos por la activación de ICAM-3 en linfocitos T como la co-estimulación del TCR, la agregación celular homotípica y la formación de extensiones celulares, un proceso característico de la formación de conjugados célula T-APC en el que también esta involucrada la Ser496 <sup>(98)</sup>. Por otro lado, ambas serinas parecen jugar un papel crítico en la interacción de ICAM-3 con ezrina y



moesina según refleja un trabajo posterior realizado con distintos mutantes puntuales a alanina y a aspártico por el Dr. Serrador y cols. Estos estudios despiertan un interés particular en la Ser496, cuyo mutante puntual S496D, mimetizando la fosforilación, promueve la interacción con las proteínas ERM y la distribución polarizada de ICAM-3 en el urópodo <sup>(240)</sup>.

La posible modulación de la interacción entre ICAM-3 y las proteínas ERM por la fosforilación de la primera por PKD ha sido parte de nuestros objetivos, cuyos resultados no hemos incluido en esta tesis. Realizamos ensayos de *pull-down* con las distintas proteínas de fusión GST-ICAM-3 citoplásmico reafirmando la importancia de la Ser496 en dicha interacción al observar el mutante S496A a diferencia de ICAM-3wt era incapaz de arrastrar las proteínas ERM endógenas. Estas interacciones se rescataban al fosforilar los distintos mutantes con la proteína de fusión GST-PKD1cat-WT. Sin embargo, dado que PKD también interacciona *in vitro* con las proteínas ERM, ha sido imposible discernir con este tipo de estudios si la recuperación de la banda de las proteínas ERM en los *pull-downs* de ICAM-3 se debe a la fosforilación de su dominio citoplásmico o a la mera presencia de PKD.

ICAM-3 participa en el establecimiento del contacto inicial entre el linfocito T y la APC <sup>(185)</sup>. Además, es una molécula co-estimuladora que se fosforila en respuesta a la activación del TCR. Todo ello la posiciona como un actor principal en los estadios iniciales de la respuesta inmune previos a la formación de la SI. Estos datos sumados a la identificación de ICAM-3 como potencial sustrato *in vivo* de PKD trazan un enorme paralelismo entre estas dos proteínas. PKD también es reclutada de forma extraordinariamente rápida a la zona de contacto célula T-APC nada más tener lugar la interacción <sup>(256)</sup>, planteando su posible papel en el establecimiento de una plataforma de señalización para la formación de la SI. PKD ha sido recientemente implicada en la regulación de la actividad de integrinas  $\beta 1$  en linfocitos <sup>(176)</sup>, y la activación de integrinas es un proceso clave que permite el cambio de un estado

móvil, de exploración y detección del complejo MHC-péptido en la superficie de la APC por parte del linfocito T, a la formación de un conjugado estable linfocito T-APC. De forma paralela, la señalización a través de ICAM-3 también modula las interacciones mediadas por integrinas <sup>(29, 30)</sup>. Dentro de nuestros objetivos actuales se haya el estudiar las implicaciones que la fosforilación por PKD de ICAM-3 tiene sobre esta última y sobre la activación de integrinas en este modelo celular.

## **D8- PKD, una quinasa implicada en los procesos de adhesión de los linfocitos T**

### **D8.1- PKD participa en la adhesión célula T-MEC**

Los ensayos de adhesión a Fn de células Peer expresando GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca y GFP-PKD1km han demostrado la expresión de la forma silvestre de PKD es capaz de promover la adhesión a Fn (Fig. R23).

Tanto la sobre-expresión de GFP-PKD1wt como de los mutantes GFP-PKD1ca y GFP-PKD1km aumentan la adhesión celular a Fn promovida por PDBu (Fig. R23A). Este resultado indica que la regulación de la adhesión a Fn (ligando de integrinas  $\beta 1$ ) llevada a cabo por PKD es independiente de su actividad quinasa. Este dato concuerda con las conclusiones extraídas del trabajo realizado por el Dr. Medeiros y cols. que demostró que la regulación del reagrupamiento de integrinas  $\beta 1$  en células T por PKD no depende de su actividad quinasa <sup>(176)</sup>. Sin embargo, dicho trabajo no obtenía variaciones significativas en la adhesión a Fn de las células Jurkat al expresar GFP-PKD1wt o GFP-PKD1km. Curiosamente, este mismo estudio si observaba disminuciones en la adhesión a Fn al expresar construcciones carentes del dominio PH (GFP-PKD1wt  $\Delta$ PH o GFP-PKD1km  $\Delta$ PH); un resultado cuyos autores interpretan como el efecto de la incapacidad de estas construcciones truncadas para asociarse a Rap1. De este modo se desacoplaría la activación y translocación de Rap1 a la membrana plasmática y la consiguiente activación de las integrinas

β1. Estos autores pasan sin embargo de puntillas por los resultados de estudios previos que identifican al dominio PH como responsable del exporte nuclear de la proteína, señalando una fuerte acumulación nuclear en linfocitos B de la construcción GFP-PKD1wt ΔPH<sup>(169)</sup>.

Nuestros datos parecen evidenciar la importancia de la correcta localización de PKD para la regulación de la adhesión a Fn, esto explicaría las diferencias entre la situación basal donde solo GFP-PKD1wt es capaz de promover cierto aumento de la adhesión frente a la situación tras la estimulación con PDBu, donde la sobre-expresión de cualquiera de las tres construcciones induce un fuerte aumento de la adhesión con respecto al control (Fig. R23A). No debemos olvidar que, como bien han descrito numerosos trabajos y hemos comprobado en células Peer (Fig. R22) la estimulación con é.f induce la rápida y transitoria translocación de PKD a la membrana plasmática<sup>(228)</sup>. Dicha redistribución no depende de su actividad quinasas para la ida pero que sí parece requerir de las serinas 744/748 intactas para su regreso al citoplasma en un proceso mediado por PKC<sup>(167, 217)</sup>. Este hecho fundamental, ligado a la enorme importancia de la localización celular de PKD (en membrana, citosol o núcleo) en las funciones en linfocitos<sup>(160)</sup> explicaría las diferencias observadas en nuestros ensayos entre GFP-PKDwt y las dos versiones mutantes. En línea con estos últimos comentarios, los resultados obtenidos con los pre-tratamientos de las células con el inhibidor farmacológico de PKC GF-I demuestran claramente la dependencia de las vías de PKC en el efecto sobre la adhesión mediado por la sobre-expresión de PKD tanto en condiciones basales como al estimular con PDBu (Fig. R23B).

#### **D8.2- PKD participa en la adhesión intercelular homotípica en linfocitos T**

La inducción de la agregación celular con é.f en células Peer que expresan GFP-PKD1wt, GFP-PKD1ca y

GFP-PKD1km nos ha permitido demostrar por vez primera la implicación de la actividad de PKD en los procesos que regulan la interacción célula-célula en linfocitos T (Fig. R24). En este caso, y a diferencia de la adhesión a Fn, la actividad del enzima es fundamental, no observándose efecto alguno en células que expresan la versión sin actividad quinasas (Fig. R24).

Ensayos realizados con poblaciones GFP-PKD1wt<sup>+</sup> nos han permitido demostrar que su sola expresión ectópica es capaz de aumentar ligeramente la agregación basal, a la par que potencia la promovida en respuesta al Ac anti-ICAM-3 pro-agregatorio HP2/19 (Fig. R25). Más aún, el tratamiento con el Ac anti-ICAM-3 TP1/24, un Ac que anteriores trabajos han utilizado para bloquear las interacciones de ICAM-3 con sus ligandos, y los consiguientes efectos derivados de dicha interacción<sup>(29)</sup>, nos ha permitido determinar que la adhesión celular promovida por PKD es dependiente de ICAM-3 (Fig. R26).

La integrina LFA-1 es el principal ligando de ICAM-3 expresado en linfocitos T. Un exhaustivo estudio del sitio de unión de LFA-1 en ICAM-3 permitió determinar que esta integrina se unía a través del primer dominio tipo Ig2 y clasificó una quincena larga de Ac anti-ICAM-3 en función de su capacidad de bloquear la interacción ICAM-3/LFA-1<sup>(131)</sup>. Este análisis permitió establecer la lista de Ac anti-ICAM-3 que se unen al sitio de unión de LFA-1 en ICAM-3, siendo HP2/19 uno de ellos. Estos Ac que reconocen el sitio de unión de LFA-1 en ICAM-3 han sido utilizados por su capacidad para mimetizar la unión de esta molécula de adhesión con su contra-receptor y así poder estudiar las vías de transducción inducidas tras la unión de ICAM-3 a LFA-1. Los tratamientos con el Ac HP2/19 provocan la activación de PKD de forma lenta y sostenida, observándose un incremento significativo de PKD-Pser916 a partir de las 2h de tratamiento de células Peer (Fig. R27A). Este aumento de la fosforilación de PKD es el primer indicio de su posible participación en las vías de señalización *outside-*

*in* inducidas por la interacción de ICAM-3 con su ligando e implicadas en la regulación de las propiedades adhesivas de las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , tanto en linfocitos T <sup>(29, 30)</sup> como en neutrófilos <sup>(64)</sup>. En connivencia con este resultado, un estudio realizado en neutrófilos demostró, mediante el uso de inhibidores farmacológicos de PKC, la participación de estas en la agregación celular inducida con Ac anti-ICAM-3 <sup>(64)</sup>. Sin embargo, el tratamiento con HP2/19 pese a provocar un aumento en la fosforilación/activación de PKD, no provoca cambios significativos en la interacción de la quinasa con ICAM-3 ni en su localización en células Peer (Fig. R27 y R28)

En células JHM1-2.2, PKD e ICAM-3 siguen interaccionando a pesar de no presentar una distribución polarizada (Fig. R29). Sin embargo, la estimulación de la adhesión intercelular y la polarización de ICAM-3 por el Ac HP2/19 en esta línea celular no induce la translocación de GFP-PKDwt, ni la expresión de la quinasa modifica en nada la distribución de ICAM-3 en estas células (Fig. R31A y B). Estos estudios sin embargo, nos han hecho descubrir que la fracción fosforilada/activa de PKD endógena se concentra en el centro de los agregados de células JHM1-2.2 que se forman por la acción del Ac HP2/19 (Fig. R31B y C).

A su vez, las tinciones puntuales obtenidas con el Ac Pser916 tanto en células Peer (Fig. R17) como en JHM1-2.2 (Fig. R31) presagian la probable asociación de la fracción activa de PKD a algún orgánulo intracelular que por la distribución observada - en el polo posterior de las células en las proximidades de ICAM-3 en Peer (Fig. R17), y en lo que morfológicamente corresponde al cuello del urópodo de las células JHM1-2.2 (Fig. R35)- bien podría corresponder al aparato de Golgi. No en vano, PKD se encuentra asociada al Golgi en otros modelos celulares <sup>(145, 209)</sup>. Aunque los estudios realizados en linfocitos hasta el día de hoy señalan a PKD como una proteína citoplasmática, que se asocia a la membrana plasmática solo en respuesta a estímulos <sup>(169, 176, 256)</sup>, nadie ha

estudiado que ocurre con la fracción activa endógena en estas células. La redistribución de esta fracción activa de PKD al centro de los agregados, en la zona de contacto entre las distintas células que lo conforman (Fig. R31B y C y R35B), y su posible asociación al aparato de Golgi, concordarían con la ampliamente descrita re-localización del aparato de Golgi a la par que el MTOC desde la parte posterior de los linfocitos a las zona de contacto célula-célula durante las interacciones inmunes <sup>(234)</sup>.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican por primera vez la participación de PKD en los procesos de adhesión célula-célula en linfocitos. La agregación celular provocada por la sobre-expresión de PKD en linfocitos T (Figs. R24-R26) plantea un posible paralelismo con la situación previamente descrita en células de cáncer de mama en donde la sobre-expresión de PKD también promueve la agregación celular <sup>(115)</sup>. De idéntica manera a lo observado para ICAM-3 en linfocitos, en células de cáncer de mama, PKD también co-localiza, interacciona y fosforila otra familia de moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las Ig, las caderinas. Así, al igual que ICAM-3, las caderinas también poseen un gran número de residuos fosforilables en un corto segmento de su dominio citoplasmático y también presentan dos serinas muy próximas la una de la otra potencialmente fosforilables por PKD que no se corresponden exactamente con la secuencia consenso de dicha quinasa. Curiosamente, dichas fosforilaciones también regulan la asociación de la molécula de adhesión al CK de actina a través de proteínas intermediarias, modulando a su vez la adhesión celular, de un modo muy similar a lo que ocurre con ICAM-3 en linfocitos T.

Por otro lado, los efectos de PKD sobre la adhesión homotípica entre células T bien podrían deberse al papel ejercido por esta quinasa en la regulación de la activación de Rap1. Así el reciente estudio del Dr. Medeiros y cols. ha demostrado la importancia de PKD como molécula adaptadora fundamental en la re-localización a la membrana plasmática de Rap1 y en su

interacción y activación de las integrinas  $\beta 1$  <sup>(176)</sup>. Teniendo en cuenta el importante papel jugado por Rap1 en la activación tanto de las integrinas  $\beta 1$  como de LFA-1 en linfocitos, y conociendo la importancia de esta última en las interacciones célula-célula, sería factible que PKD desarrolle un papel análogo en el caso de Rap1 y LFA-1.

## D9- PKD promueve la motilidad de los linfocitos T

PKD promueve la motilidad sobre Fn en la línea de linfocitos T Peer (Fig. R33). Estos son los primeros resultados que relacionan la migración en linfocitos con PKD, un proceso que podría presentar similitudes con el observado en otros modelos celulares. Así dos estudios han relacionado la actividad de PKD con la motilidad de los fibroblastos <sup>(210, 300)</sup>. El primero de ellos demostró la necesidad de la actividad de PKD para el tráfico anterógrado de membranas desde el trans-Golgi al frente de avance y la localización de Rac-1 en dicha región, dos requisitos indispensables para la locomoción de los fibroblastos <sup>(210)</sup>. El segundo trabajo relacionó la actividad de PKD con el reciclaje de la integrina  $\alpha v\beta 3$  hacia los nuevos contactos focales en formación en las extensiones celulares del frente de avance de los fibroblastos que permiten la motilidad celular <sup>(300)</sup>. Además, estos autores demuestran la necesaria interacción entre PKD y la subunidad  $\beta 3$  para la regulación del transporte vesicular de estas integrinas hacia la superficie celular.

PKD también interacciona con integrinas (en este caso  $\beta 1$ ) en linfocitos T y, al igual que en fibroblastos, esta asociación depende del extremo C-terminal del dominio citoplasmático de la cadena  $\beta$  y no es constitutiva <sup>(176)</sup>.

Por otro lado, en linfocitos T, la internalización y el reciclaje de LFA-1, a través de mecanismos que implican al dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta 2$ , parecen jugar un papel crítico en el desprendimiento del sustrato de la parte posterior de los linfocitos T, un proceso clave para la motilidad de las células <sup>(275)</sup>.

Teniendo en cuenta que en linfocitos T polarizados PKD se encuentra enriquecido en el polo posterior de las células (Fig. R14) y que, como hemos podido comprobar en los ensayos de video-microscopía confocal, se re-localiza en la parte trasera de las células más motiles (Fig. R30), es bastante plausible que PKD pudiera regular estos procesos de desprendimiento del sustrato. Así la regulación del reagrupamiento de integrinas <sup>(176)</sup> y el control del reciclaje de estas a la membrana plasmática <sup>(300)</sup> bien podrían ser dos de los motivos que explicasen el papel positivo desarrollado por PKD en la motilidad de los linfocitos T.

## D10- Participación de PKD en la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$

Mediante ensayos de migración en cámaras *transwell* sobre-expresando distintos mutantes de PKD hemos demostrado la implicación de la actividad de PKD en la respuesta quimiotáctica a SDF-1 $\alpha$  de la línea de linfocitos T polarizados Peer (Fig. R32).

Esta participación de PKD en la quimiotaxis inducida por SDF-1 $\alpha$  bien podría explicarse por la probada relación en linfocitos T de esta quinasa con las GTPasas Rho y Rap1 <sup>(176, 189)</sup>. Ambas proteínas han sido implicadas en la señalización en respuesta a SDF-1 $\alpha$  en las células T; promoviendo la migración al controlar la formación del urópodo y regular la contracción del CK de actomiosina en el caso de Rho <sup>(254)</sup>; e induciendo la polaridad, regulando el reagrupamiento y la afinidad de las integrinas y facilitando el desplazamiento sobre sustrato y la trans migración en el caso de Rap1 <sup>(244)</sup>.

Otra posible explicación del papel de PKD en la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$  sería su participación en la internalización o reciclaje de CXCR4. Varios trabajos han demostrado en distintos modelos celulares que el bloqueo o reducción de su endocitosis en respuesta a SDF-1 $\alpha$  provoca una disminución de la quimiotaxis <sup>(50, 153)</sup>. A su vez un estudio con mutantes de delección de CXCR4 ha demostrado que la cola C-terminal citoplásmica es

necesaria y juega un papel crítico en la internalización y la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 no afectando ni a la activación sostenida de la ERK1/2 ni al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular <sup>(225)</sup>. La importancia de este dominio C-terminal en la internalización del receptor ha sido profundamente estudiada por otros autores que han demostrado que la endocitosis del receptor depende de múltiples serinas potencialmente fosforilables presentes en este segmento de la proteína <sup>(198, 247)</sup>. Mediante el uso de distintos inhibidores farmacológicos, estos y otros trabajos han implicado la participación de las vías de señalización de PKC en la internalización de CXCR4 en respuesta a la activación del BCR, del TCR o a la estimulación con é.f. en linfocitos B y T respectivamente <sup>(86, 246, 247, 269)</sup>. Dicha internalización de CXCR4 mediada por las vías de PKC depende de un dominio S(X)nLL también presente en la subunidad  $\gamma$  de CD3 y responsable de la endocitosis del complejo TCR/CD3 dependiente de PKC <sup>(49, 182, 198, 247, 293)</sup>. De forma interesante, la serina de este dominio S(X)nLL crítica para la internalización de CXCR4 mediada por las vías de PKC presenta una secuencia consenso de fosforilación por PKD.

PKD es un efector de PKC, que ha sido implicado en el tráfico vesicular en otros modelos celulares <sup>(145)</sup>. Además se recluta a membranas tras la generación de DAG <sup>(256)</sup> y participa de las vías de señalización del TCR. Adicionalmente se ha postulado un posible papel de PKD en la regulación de la endocitosis basal y mediada por Ag del TCR al regular la activación de HPK1 <sup>(10)</sup>. Todos estos datos permiten pensar que PKD pudiera estar implicado en semejantes mecanismos de reciclaje comunes para ambos receptores.

Sin embargo, existen otros resultados que sugieren que la endocitosis de CXCR4 mediada por SDF-1 $\alpha$  sigue otra vía de señalización distinta a la mediada por la estimulación con é.f., no viéndose afectada por el uso de inhibidores de PKC <sup>(247)</sup>. A pesar de ello, el tratamiento con inhibidores de dichas vías afecta notablemente la migración de los linfocitos T en

respuesta a SDF-1 $\alpha$  <sup>(57)</sup>. No es descartable por lo tanto que la fosforilación por PKD de esta cola citoplasmática tenga lugar en presencia de la quimioquina, y que esta tenga un efecto directo sobre la quimiotaxis independiente de la internalización del receptor.

Experimentos dirigidos a esclarecer este punto serían de gran importancia para dilucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales PKD actúa positivamente sobre la quimiotaxis inducida por SDF-1 $\alpha$  en linfocitos T.

Al igual que en el caso de la estimulación con HP2/19, el tratamiento de las células Peer con SDF-1 $\alpha$  también promueve la fosforilación de PKD (Fig. R34A). Estos aumentos de fosforilación son bastante tenues si los comparamos con los promovidos al tratar las células con PDBu. Este hecho puede indicar que los estímulos fisiológicos provocan efectos menos drásticos a los observados con los é.f. A su vez, la interesante aparición de una banda de menor peso molecular a los 30min de estimulación con SDF-1 $\alpha$  (Fig. 34B) podría ser debida a la proteólisis de PKD por caspasa-3 o por calpaína previamente descritas en otros trabajos <sup>(56, 127, 284)</sup>. Dicho procesamiento produce un corte entre el segundo motivo rico en cisteínas C1b y el dominio PH liberando un fragmento constitutivamente activo que escapa de la retro-regulación negativa de la actividad de PKD promovida por la unión al dominio C1a de la proteína 14-3-3 y que resulta en una inactivación del enzima <sup>(94)</sup>. A su vez este fragmento de PKD mantendría el dominio PH permitiendo su reclutamiento a membranas ricas en fosfoinosítidos <sup>(142)</sup>, regulando su localización subcelular y su interacción con otras proteínas como las PKCs <sup>(294)</sup> o la subunidades G $\beta\gamma$  <sup>(116)</sup>.

En relación con esta posibilidad, la familia de proteasas calpaína ha sido ampliamente implicada en migración en distintos modelos celulares. Así calpaína ha sido involucrada en diversos aspectos que controlan la migración, como la adhesión y extensión celular sobre sustratos, el desprendimiento del polo trasero de las

células o la señalización inducida por la activación de integrinas <sup>(70)</sup>.

Un trabajo realizado en hibridomas de células T demostró que tanto la adhesión a sustrato como la motilidad y la invasión de monocapas de fibroblastos inducidas por SDF-1 $\alpha$  implican la activación de calpaína <sup>(253)</sup>. A su vez la adhesión de células de cáncer de mama a la MEC mediada por PKD depende del procesamiento de esta por calpaína <sup>(127)</sup>. Por lo tanto, la aparición de una forma truncada de PKD en células Peer estimuladas con SDF-1 $\alpha$  abre la posibilidad de que esta sea producto de la existencia de un mecanismo de regulación de PKD por calpaína inducido por SDF-1 $\alpha$  que participara en el control de la adhesión celular, modulando de esta manera la migración.

Por último, cabe resaltar la existencia de similitudes entre las funciones ejercidas por PKD en otros tipos celulares y su papel en linfocitos. La implicación de PKD en el reciclaje de receptores al frente de avance regulando la capacidad migratoria de los fibroblastos <sup>(210, 300)</sup>, así como su participación en los procesos de invasión tumoral, interaccionando y formando complejos con cortactina en las protuberancias de membrana o invadopodios <sup>(22)</sup>, podría constituir un paralelismo con la situación en la respuesta quimiotáctica de los linfocitos T. Así en células T, al igual que lo que hemos observado para PKD, la sobre-expresión de cortactina induce la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$  y esta última ha sido involucrada en la internalización y reciclaje de CXCR4 <sup>(153)</sup>. De acuerdo con este modelo, hemos podido comprobar que PKD también se re-localiza en el extremo de las prolongaciones emitidas por las células JHM1-2.2 en respuesta a SDF-1 $\alpha$  (Fig. R35A).

La polarización inducida por SDF-1 $\alpha$  en la línea celular JHM1-2.2 redistribuye a PKD al urópodo de dichas células (Fig. R35). De idéntica forma a lo observado en linfocitos de sangre periférica por otros autores <sup>(288)</sup>, los efectos de SDF-1 $\alpha$  sobre la línea celular JHM1-2.2 son parciales (pues no todas las

células se polarizan) y dependientes del tiempo de estimulación (polarización máxima a tiempos cortos de 10min-30min). A tiempos largos de estimulación con SDF-1 $\alpha$  volvemos a observar el mismo tipo de agregados compactos que pudimos ver al tratar las células JHM1-2.2 con el Ac HP2/19. La aparición de estos agregados con la consiguiente re-localización de PKD al centro de los mismos bien podría explicarse por la regulación de las capacidades adhesivas promovida por SDF-1 $\alpha$ .

SDF-1 $\alpha$  al igual que otras quimioquinas promueve un cambio en las capacidades adhesivas de las células T, lo que *in vivo* permite el paso del rodamiento del linfocito sobre la pared de los vasos sanguíneos a la adhesión firme al endotelio, un paso previo a la extravasación de los linfocitos del torrente sanguíneo. Trabajos previos ya han descrito la inducción por quimioquinas de la adhesión homotípica en células T mediada por LFA-1 y sus contrareceptores ICAM-1 e ICAM-3. <sup>(268)</sup>. La redistribución de PKD al centro de estos agregados promovidos por SDF-1 $\alpha$  (Fig. 35B), así como la acumulación de GFP-PKDwt en los extremos de las extensiones celulares que contactan con las células vecinas promovidas tras la inducción con SDF-1 $\alpha$  (Fig. 35A), son nuevos indicios de la probable participación de PKD en las adhesiones celulares reguladas por SDF-1 $\alpha$ .

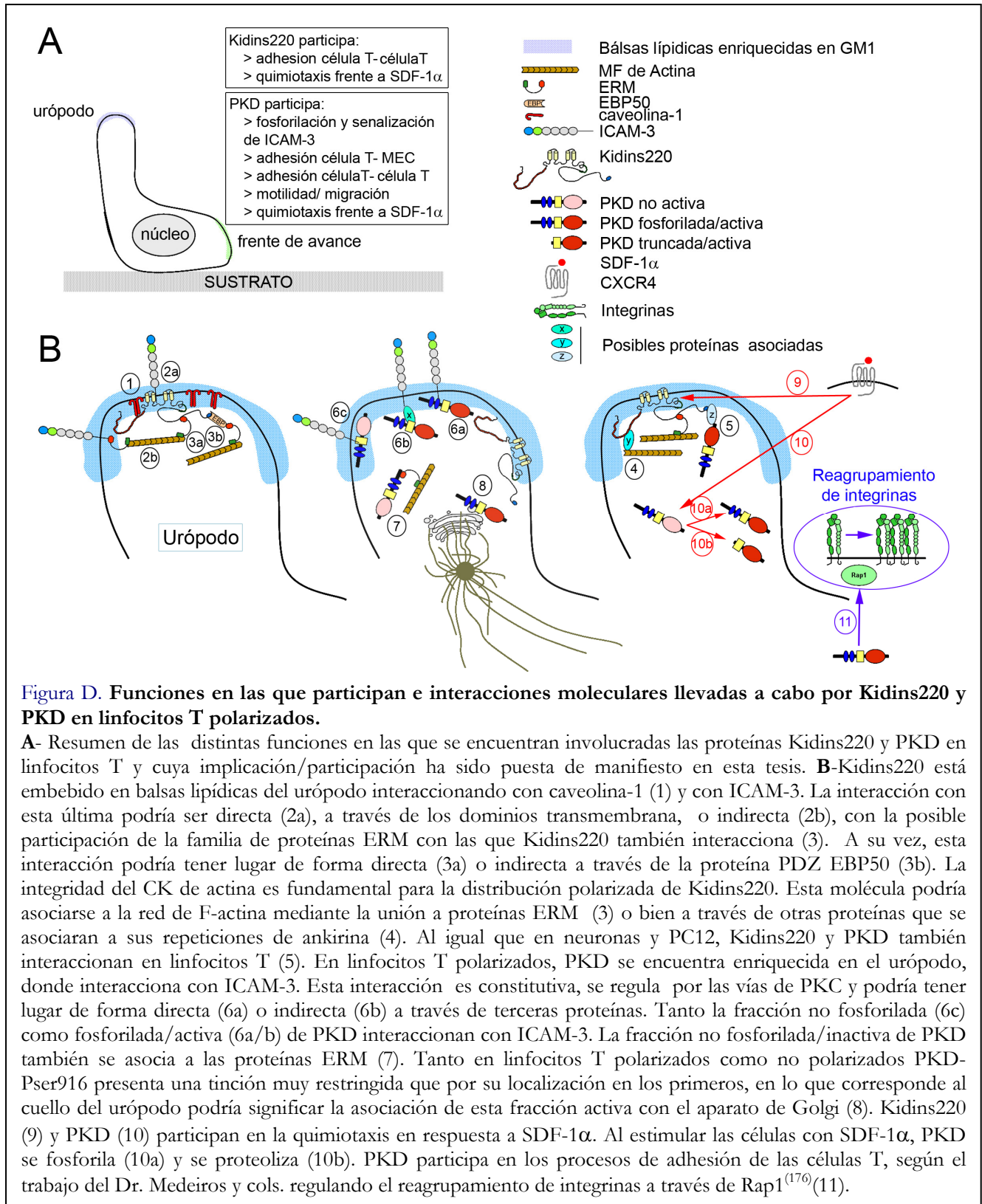
### **D11-¿Que ocurre con las distintas isoformas de PKD en linfocitos?**

Hasta el día de hoy, PKD1 ha sido la isoforma más estudiada de la familia PKD. Existe una enorme similitud de los tres integrantes de esta familia de quinasas cuyos módulos constituyentes de sus dominios reguladores así como sus regiones catalíticas presentan una alta conservación, lo que hace prever posibles redundancias funcionales y ha imposibilitado el establecimiento de funciones específicas para cada isoforma. Poco o nada se ha avanzado en el estudio de PKD2 y 3 en linfocitos. Sus mecanismos de activación siendo idénticos a los de PKD1 en otras células <sup>(217-219)</sup>,



se ha descrito que PKD3 también se activa en respuesta a la estimulación antigénica del BCR<sup>(168)</sup>. Las distintas isoformas de PKD pueden a su vez estar asociadas a distintos compartimentos y orgánulos

celulares, incluido el núcleo<sup>(216, 219)</sup>, dependiendo del tipo celular y del estímulo<sup>(111, 218)</sup> (Revisado en 228). La activación de PKD va unida a cambios en la localización de la proteína. El dinamismo de estas





proteínas las convierte en un probable actor principal implicado en la unión entre los estímulos de distintos receptores de membrana y los distintos procesos intracelulares tanto citoplasmáticos como nucleares. Así, las diferencias en la regulación de la distribución intracelular de cada isoforma podrían abrir la puerta a la futura comprensión del papel específico ejercido por las distintas isoformas de PKD en la respuesta inmune. En estos últimos años, y con el fin de esclarecer las funciones específicas de las distintas isoformas, la tecnología de ARNi ha sido empleada en distintos tipos celulares<sup>(36, 265)</sup>, los linfocitos T entre ellos<sup>(176)</sup>. En este último trabajo, realizan ARNi de PKD1, sin conseguir eliminar sus niveles por completo, para demostrar que dicha isoforma es responsable de las acciones que lleva a cabo Rap1 sobre el reagrupamiento de integrinas  $\beta 1$ . Sorprendentemente, durante la escritura de esta tesis, dos trabajos demuestran que, contrariamente a lo establecido de forma general hasta la actualidad, los linfocitos T no expresan PKD1 sino PKD2<sup>(111, 133)</sup>. La confusión PKD1-PKD2 a nivel de proteína es fácilmente explicable debido a que ambas presentan un peso molecular muy similar y contienen una enorme identidad de secuencia. De hecho, hoy en día se sabe que los Ac comerciales de PKD1 total y fosforilada también reconocen a PKD2. Este dato no invalida sin embargo la mayoría de las conclusiones observadas hasta el día de hoy en estas células debido al extraordinario parecido de estas dos isoformas. Es sumamente probable que los sustratos establecidos para PKD1 lo sean también para PKD2, e incluso para PKD3. Así un buen ejemplo de este hecho vendría dado por las HDAC de tipo 2 HDAC7 y HDAC5. Inicialmente descritas como sustratos de PKD1 en linfocitos T<sup>(48)</sup>, la aparición de estudios posteriores ha demostrado la redundancia funcional de PKD1 y PKD3 *in vivo* en linfocitos B<sup>(170)</sup> así como la capacidad de las tres isoformas de PKD para fosforilar *in vitro* a HDAC5, siendo incluso mayor la fosforilación por

PKD2 que por las otras dos isoformas<sup>(106)</sup>. Nuestros propios datos corroboran este hecho con Kidins220, primer sustrato fisiológico identificado para PKD1<sup>(107)</sup>, fosforilado *in vitro* por las tres isoformas<sup>(233)</sup>. Sin embargo, y en este contexto, el descubrimiento reciente de que los linfocitos T no expresan PKD1, pone en cuestión la validez de los resultados obtenidos por la aproximación de ARNi por el Dr. Medeiros y cols.<sup>(176)</sup>. Finalmente, debemos discutir este hecho en el contexto de los resultados obtenidos en esta tesis. En este estudio hemos utilizado linfocitos T como sistema modelo, tal y como han hecho hasta la fecha numerosos trabajos de investigación que han ayudado a esclarecer diversas funciones de PKD1. Si bien es cierto que es necesario investigar en profundidad la función de PKD2 y PKD3 en esta línea celular, incluyendo ensayos ARNi, la ausencia de PKD1 en linfocitos T, convierte a estas células en un excelente modelo en el que estudiar los efectos de la expresión de dicha isoforma sobre las distintas funciones celulares.





## **CONCLUSIONES**



1- Kidins220 se expresa en linfocitos T, concentrándose en el urópodo de las células T polarizadas co-localizando con ICAM-3, CD44 y CD43.

2- Kidins220 está parcialmente embebido en balsas lipídicas ricas en GM1 del urópodo cuya integridad es crucial para la distribución polarizada de la proteína en las células T. Los linfocitos T expresan caveolina-1, proteína con la que interacciona Kidins220 en células T polarizadas.

3- Kidins220 interacciona con ICAM-3 y las proteínas ERM en linfocitos T polarizados. La distribución polarizada de Kidins220 así como su asociación con ICAM-3 dependen de mecanismos que involucran al citoesqueleto de actina así como a las vías de PKC.

4- Kidins220 participa en los procesos de adhesión celular homotípica de los linfocitos T y en la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$ .

5- PKD está parcialmente enriquecido en el urópodo de las células T polarizadas, interaccionando con Kidins220 e ICAM-3 por mecanismos regulados por las vías de PKC.

6- Las vías de PKC regulan la interacción de P-ERM con ICAM-3.

7- PKD interacciona con las proteínas ERM pero no es capaz de fosforilarlas *in vitro*. Sin embargo, PKD fosforila *in vitro* el dominio citoplásmico de ICAM-3 en varios residuos, siendo las serinas 489 y 496 los candidatos más probables a ser fosforilados por esta quinasa.

8- La sobre-expresión de PKD induce la adhesión a Fn de forma independiente de su actividad.

La actividad de PKD induce la adhesión intercelular homotípica en linfocitos T de forma dependiente de ICAM-3. La activación de ICAM-3 promueve la fosforilación de PKD en células Peer y la redistribución de su fracción fosforilada/activa al centro de los agregados celulares en JHM1-2.2.

9- PKD induce la motilidad de los linfocitos T polarizados. La actividad de PKD regula la trans migración y aumenta la quimiotaxis en respuesta a SDF-1 $\alpha$  en células T polarizadas. PKD participa en las vías de señalización de SDF-1 $\alpha$  y se re-localiza al urópodo de las células JHM1-2.2 tras la polarización inducida por SDF-1 $\alpha$ .





# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Gran parte de las abreviaturas y acrónimos proceden del inglés y como tal se han mantenido

|  |  |
|--|--|
| <b>aa:</b> aminoácidos   | <b>GPCR:</b> Receptores de siete hélices transmembrana acoplados a proteínas G |
| <b>Ac:</b> Anticuerpo  | <b>GPI:</b> Glicofosfatidilinositol  |
| <b>Ag:</b> Antígeno  | <b>GRKs :</b> <i>G protein-coupled Receptor Kinase</i>                         |
| <b>ADNc:</b> ADN copia   | <b>GST:</b> Glutation-S-Transferasa  |
| <b>anti-Tmb:</b> anti-Kidins220 transmembrana                    | <b>HDAC:</b> Histona DeAcetilasa   |
| <b>APC:</b> Células presentadoras de antígeno                    | <b>HPK1:</b> <i>Hematopoietic Progenitor Kinase 1</i>                          |
| <b>Arg:</b> Arginina   | <b>ICAM:</b> <i>InterCellular Adhesion Molecule</i>                            |
| <b>ARMS:</b> <i>Ankyrin-Rich Membrane Spanning</i>               | <b>IL-2:</b> InterLeukina-2  |
| <b>ARNm:</b> ARN mensajero                                       | <b>Ig:</b> Inmunoglobulinas  |
| <b>ARNi:</b> ARN de interferencia                                | <b>Kidins220:</b> <i>Kinase d-interacting substrate of 220 kDa</i>             |
| <b>Asp:</b> Ácido Aspártico                                      | <b>LFA-1:</b> <i>Lymphocyte Function asociated Antigen 1</i>                   |
| <b>céls/ml:</b> Células por ml                                   | <b>MAPK:</b> <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>                           |
| <b>CaMK:</b> Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina quinasa               | <b>MCDX:</b> Metil-β-CicloDeXtrina   |
| <b>Cit.D:</b> Citocalasina D                                     | <b>MEC:</b> Matriz ExtraCelular  |
| <b>CK:</b> Citoesqueleto   | <b>MHC:</b> Complejo mayor de histocompatibilidad                              |
| <b>CKR:</b> Receptores de quimioquinas                           | <b>MLCK:</b> <i>Miosin Light Chain Kinase</i>                                  |
| <b>cpm:</b> cuentas por minuto                                   | <b>MTOC:</b> Centro organizador de microtúbulos                                |
| <b>CRD:</b> <i>Cystein Rich Domain</i>                           | <b>NGF:</b> Factor de crecimiento neuronal                                     |
| <b>CTB:</b> Toxina Colérica B                                    | <b>N-terminal:</b> Amino terminal  |
| <b>C-terminal:</b> Carboxilo terminal                            | <b>pb:</b> pares de bases  |
| <b>DAG:</b> Diacilglicerol                                       | <b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa                                |
| <b>DC-SIGN:</b> <i>DC-specific ICAM-Grabbing Non integrin</i>    | <b>PDBu:</b> Forbol-12,13-di-butilato  |
| <b>D.O:</b> Densidad Óptica                                      | <b>PDZ:</b> <i>Postsynaptic density-95/Discs large/Zonula occludens-1</i>      |
| <b>EBP50:</b> <i>ERM-Binding Phosphoprotein 50</i>               | <b>PHA-L:</b> Fitohemaglutinina-L  |
| <b>Ensayos IVK:</b> Ensayos de actividad quinasa <i>in vitro</i> | <b>PI3K:</b> Fosfatidilinositol-3 quinasa                                      |
| <b>é.f :</b> ésteres de forbol                                   | <b>PKC:</b> Proteína quinasa C   |
| <b>ERM:</b> Ezrina/Radixina/Moesina                              | <b>PKD:</b> Proteína quinasa D   |
| <b>F-actina:</b> actina filamentosa                              | <b>PLC:</b> Fosfolipasa C  |
| <b>FBS:</b> Suero bovino fetal                                   | <b>PSGL-1:</b> <i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>                         |
| <b>FERM:</b> <i>Four.1-Ezrin-Radixin-Moesin</i>                  | <b>ROCK:</b> <i>RbO Coiled-coil Kinase</i>                                     |
| <b>Fn:</b> Fibronectina  | <b>SAM:</b> <i>Sterile-α-Motif</i>   |
| <b>GAP:</b> Proteínas activadoras de la actividad GTPasa         | <b>SDF-1α:</b> <i>Stromal cell Derived Factor 1 alpha</i>                      |
| <b>GEF:</b> Factor intercambiador de nucleótidos de guanina      | <b>Ser:</b> Serina   |
| <b>GFP:</b> Proteína verde fluorescente                          | <b>SI:</b> Sinápsis Inmunológica   |
| <b>GF-I:</b> Bis-indoilmaleimida                                 | <b>SMAC:</b> <i>SupraMolecular Activation Cluster</i>                          |
| <b>Glu:</b> Ácido Glutámico                                      | <b>cSMAC:</b> <i>central SMAC</i>  |
| <b>GM1:</b> Gangliósido de tipo 1                                | <b>pSMAC:</b> <i>peripheral SMAC</i>   |

**TCR:** Receptor de antígeno de las células T

**Thr:** Treonina

**Tyr:** Tirosina

**VIH:** Virus de la Immunodeficiencia Humana

**VLA-4:** Very Late Antigen 4

**WB:** Western Blot

**WAS:** Síndrome de Wiskott Aldrich

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. **Aasheim HC, Delabie J, and Finne EF.** Ephrin-A1 binding to CD4+ T lymphocytes stimulates migration and induces tyrosine phosphorylation of PYK2. *Blood* 105: 2869-2876, 2005.
2. **Abedi H, Rozengurt E, and Zachary I.** Rapid activation of the novel serine/threonine protein kinase, protein kinase D by phorbol esters, angiotensin II and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 427: 209-212, 1998.
3. **Alblas J, Ulfman L, Hordijk P, and Koenderman L.** Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol Biol Cell* 12: 2137-2145, 2001.
4. **Alonso-Lebrero JL, Serrador JM, Dominguez-Jimenez C, Barreiro O, Luque A, del Pozo MA, Snapp K, Kansas G, Schwartz-Albiez R, Furthmayr H, Lozano F, and Sánchez-Madrid F.** Polarization and interaction of adhesion molecules P-selectin glycoprotein ligand 1 and intercellular adhesion molecule 3 with moesin and ezrin in myeloid cells. *Blood* 95: 2413-2419, 2000.
5. **Alonso MA and Millan J.** The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci* 114: 3957-3965, 2001.
6. **Allenspach EJ, Cullinan P, Tong J, Tang Q, Tesciuba AG, Cannon JL, Takahashi SM, Morgan R, Burkhardt JK, and Sperling AI.** ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* 15: 739-750, 2001.
7. **Aravind L, Iyer LM, Leiye DD, and Koonin EV.** A novel family of P-loop NTPases with an unusual phyletic distribution and transmembrane segments inserted within the NTPase domain. *Genome Biol* 5: R30, 2004.
8. **Arevalo JC, Pereira DB, Yano H, Teng KK, and Chao MV.** Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 281: 1001-1007, 2006.
9. **Arevalo JC, Yano H, Teng KK, and Chao MV.** A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *Embo J* 23: 2358-2368, 2004.
10. **Arnold R, Patzak IM, Neuhaus B, Vancauwenbergh S, Veillette A, Van Lint J, and Kiefer F.** Activation of hematopoietic progenitor kinase 1 involves relocation, autophosphorylation, and transphosphorylation by protein kinase D1. *Mol Cell Biol* 25: 2364-2383, 2005.
11. **Arroyo AG, Campanero MR, Sánchez-Mateos P, Zapata JM, Ursa MA, del Pozo MA, and Sánchez-Madrid F.** Induction of tyrosine phosphorylation during ICAM-3 and LFA-1-mediated intercellular adhesion, and its regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* 126: 1277-1286, 1994.
12. **Babina M, Mammeri K, and Henz BM.** ICAM-3 (CD50) is expressed by human mast cells: induction of homotypic mast cell aggregation via ICAM-3. *Cell Adhes Commun* 7: 195-209, 1999.
13. **Baggiolini M.** Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392: 565-568, 1998.
14. **Baier G.** The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunol Rev* 192: 64-79, 2003.
15. **Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, and Bachelier F.** The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280: 35760-35766, 2005.
16. **Barret C, Roy C, Montcourrier P, Mangeat P, and Niggli V.** Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J Cell Biol* 151: 1067-1080, 2000.
17. **Binnerts ME, van Kooyk Y, Simmons DL, and Figdor CG.** Distinct binding of T lymphocytes to ICAM-1, -2 or -3 upon activation of LFA-1. *Eur J Immunol* 24: 2155-2160, 1994.
18. **Bleijds DA, Geijtenbeek TB, Figdor CG, and van Kooyk Y.** DC-SIGN and LFA-1: a battle for ligand. *Trends Immunol* 22: 457-463, 2001.
19. **Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, and Springer TA.** The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382: 829-833, 1996.
20. **Bork P.** Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins* 17: 363-374, 1993.

21. **Bossy D, Buckley CD, Holness CL, Littler AJ, Murray N, Collins I, and Simmons DL.** Epitope mapping and functional properties of anti-intercellular adhesion molecule-3 (CD50) monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 25: 459-465, 1995.
22. **Bowden ET, Barth M, Thomas D, Glazer RI, and Mueller SC.** An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* 18: 4440-4449, 1999.
23. **Bretscher A, Edwards K, and Fehon RG.** ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 586-599, 2002.
24. **Brown MJ, Nijhara R, Hallam JA, Gignac M, Yamada KM, Erlandsen SL, Delon J, Kruhlak M, and Shaw S.** Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood* 102: 3890-3899, 2003.
25. **Burger JA and Kipps TJ.** CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107: 1761-1767, 2006.
26. **Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, and Schall TJ.** A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203: 2201-2213, 2006.
27. **Butcher EC, Williams M, Youngman K, Rott L, and Briskin M.** Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 72: 209-253, 1999.
28. **Cabrera-Poch N, Sánchez-Ruiloba L, Rodríguez-Martínez M, and Iglesias T.** Lipid raft disruption triggers protein kinase C and Src-dependent protein kinase D activation and Kidins220 phosphorylation in neuronal cells. *J Biol Chem* 279: 28592-28602, 2004.
29. **Campanero MR, del Pozo MA, Arroyo AG, Sánchez-Mateos P, Hernandez-Caselles T, Craig A, Pulido R, and Sánchez-Madrid F.** ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J Cell Biol* 123: 1007-1016, 1993.
30. **Campanero MR, Sánchez-Mateos P, del Pozo MA, and Sánchez-Madrid F.** ICAM-3 regulates lymphocyte morphology and integrin-mediated T cell interaction with endothelial cell and extracellular matrix ligands. *J Cell Biol* 127: 867-878, 1994.
31. **Caroni P.** New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *Embo J* 20: 4332-4336, 2001.
32. **Cid MC, Esparza J, Juan M, Miralles A, Ordi J, Vilella R, Urbano-Marquez A, Gaya A, Vives J, and Yague J.** Signaling through CD50 (ICAM-3) stimulates T lymphocyte binding to human umbilical vein endothelial cells and extracellular matrix proteins via an increase in beta 1 and beta 2 integrin function. *Eur J Immunol* 24: 1377-1382, 1994.
33. **Cordell JL, Pulford K, Turley H, Jones M, Micklem K, Doussis IA, Tyler X, Mayne K, Gatter KC, and Mason DY.** Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3. *J Clin Pathol* 47: 143-147, 1994.
34. **Chao MV.** Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4: 299-309, 2003.
35. **Charrin S and Alcover A.** Role of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in T lymphocyte polarization, immune synapse formation and in T cell receptor-mediated signaling. *Front Biosci* 11: 1987-1997, 2006.
36. **Chen J, Lu G, and Wang QJ.** Protein kinase C-independent effects of protein kinase D3 in glucose transport in L6 myotubes. *Mol Pharmacol* 67: 152-162, 2005.
37. **Das V, Nal B, Roumier A, Meas-Yedid V, Zimmer C, Olivo-Marin JC, Roux P, Ferrier P, Dautry-Varsat A, and Alcover A.** Membrane-cytoskeleton interactions during the formation of the immunological synapse and subsequent T-cell activation. *Immunol Rev* 189: 123-135, 2002.
38. **de Fougères AR, Klickstein LB, and Springer TA.** Cloning and expression of intercellular adhesion molecule 3 reveals strong homology to other immunoglobulin family counter-receptors for lymphocyte function-associated antigen 1. *J Exp Med* 177: 1187-1192, 1993.

39. **de Fougères AR and Springer TA.** Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* 175: 185-190, 1992.
40. **del Pozo MA, Alderson NB, Kiosses WB, Chiang HH, Anderson RG, and Schwartz MA.** Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* 303: 839-842, 2004.
41. **del Pozo MA, Cabanas C, Montoya MC, Ager A, Sánchez-Mateos P, and Sánchez-Madrid F.** ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J Cell Biol* 137: 493-508, 1997.
42. **del Pozo MA, Campanero MR, Sánchez-Mateos P, Arroyo AG, Pulido R, Munoz C, Hernández-Caselles T, Aparicio P, and Sánchez-Madrid F.** Role of ICAM-3 in intercellular adhesion and activation of T lymphocytes. *Cell Adhes Commun* 2: 211-218, 1994.
43. **del Pozo MA, Nieto M, Serrador JM, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Martínez C, and Sánchez-Madrid F.** The two poles of the lymphocyte: specialized cell compartments for migration and recruitment. *Cell Adhes Commun* 6: 125-133, 1998.
44. **del Pozo MA, Pulido R, Munoz C, Alvarez V, Humbria A, Campanero MR, and Sánchez-Madrid F.** Regulation of ICAM-3 (CD50) membrane expression on human neutrophils through a proteolytic shedding mechanism. *Eur J Immunol* 24: 2586-2594, 1994.
45. **del Pozo MA, Sánchez-Mateos P, Nieto M, and Sánchez-Madrid F.** Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 131: 495-508, 1995.
46. **del Pozo MA, Sánchez-Mateos P, and Sánchez-Madrid F.** Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment? *Immunol Today* 17: 127-131, 1996.
47. **Delon J, Kaibuchi K, and Germain RN.** Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 15: 691-701, 2001.
48. **Dequiedt F, Van Lint J, Lecomte E, Van Duppen V, Seufferlein T, Vandenheede JR, Wattiez R, and Kettmann R.** Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J Exp Med* 201: 793-804, 2005.
49. **Dietrich J, Hou X, Wegener AM, and Geisler C.** CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *Embo J* 13: 2156-2166, 1994.
50. **Ding Y, Li M, Zhang J, Li N, Xia Z, Hu Y, Wang S, and Fan GH.** The 73-kDa heat shock cognate protein is a CXCR4 binding protein that regulates the receptor endocytosis and the receptor-mediated chemotaxis. *Mol Pharmacol* 69: 1269-1279, 2006.
51. **Doi Y, Itoh M, Yonemura S, Ishihara S, Takano H, Noda T, and Tsukita S.** Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J Biol Chem* 274: 2315-2321, 1999.
52. **Doppler H, Storz P, Li J, Comb MJ, and Toker A.** A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* 280: 15013-15019, 2005.
53. **Dustin ML.** Regulation of T cell migration through formation of immunological synapses: the stop signal hypothesis. *Adv Exp Med Biol* 512: 191-201, 2002.
54. **Dustin ML.** Stop and go traffic to tune T cell responses. *Immunity* 21: 305-314, 2004.
55. **Ebinu JO, Bottorff DA, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, and Stone JC.** RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280: 1082-1086, 1998.
56. **Endo K, Oki E, Biedermann V, Kojima H, Yoshida K, Johannes FJ, Kufe D, and Datta R.** Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *J Biol Chem* 275: 18476-18481, 2000.



57. **Entschladen F, Gunzer M, Scheuffele CM, Niggemann B, and Zanker KS.** T lymphocytes and neutrophil granulocytes differ in regulatory signaling and migratory dynamics with regard to spontaneous locomotion and chemotaxis. *Cell Immunol* 199: 104-114, 2000.
58. **Fagerholm S, Morrice N, Gahmberg CG, and Cohen P.** Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the integrin CD18 chain by protein kinase C isoforms in leukocytes. *J Biol Chem* 277: 1728-1738, 2002.
59. **Fais S, Capobianchi MR, Abbate I, Castilletti C, Gentile M, Cordiali Fei P, Ameglio F, and Dianzani F.** Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *Aids* 9: 329-335, 1995.
60. **Fais S and Malorni W.** Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions. *J Leukoc Biol* 73: 556-563, 2003.
61. **Fan GH, Yang W, Wang XJ, Qian Q, and Richmond A.** Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization. *Biochemistry* 40: 791-800, 2001.
62. **Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewicz VL, Bismuth G, Trautmann A, Germain RN, and Delon J.** ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* 5: 272-279, 2004.
63. **Fawcett J, Holness CL, Needham LA, Turley H, Gatter KC, Mason DY, and Simmons DL.** Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 360: 481-484, 1992.
64. **Feldhaus MJ, Kessel JM, Zimmerman GA, and McIntyre TM.** Engagement of ICAM-3 activates polymorphonuclear leukocytes: aggregation without degranulation or beta 2 integrin recruitment. *J Immunol* 161: 6280-6287, 1998.
65. **Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, and Berger EA.** HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877, 1996.
66. **Fievet BT, Gautreau A, Roy C, Del Maestro L, Mangeat P, Louvard D, and Arpin M.** Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* 164: 653-659, 2004.
67. **Fra AM, Pasqualetto E, Mancini M, and Sitia R.** Genomic organization and transcriptional analysis of the human genes coding for caveolin-1 and caveolin-2. *Gene* 243: 75-83, 2000.
68. **Fra AM, Williamson E, Simons K, and Parton RG.** De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8655-8659, 1995.
69. **Fra AM, Williamson E, Simons K, and Parton RG.** Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem* 269: 30745-30748, 1994.
70. **Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ, Han J, Bennin DA, Critchley DR, and Huttenlocher A.** Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* 6: 977-983, 2004.
71. **Friedl P, Entschladen F, Conrad C, Niggemann B, and Zanker KS.** CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur J Immunol* 28: 2331-2343, 1998.
72. **Fureder W, Agis H, Sperr WR, Lechner K, and Valent P.** The surface membrane antigen phenotype of human blood basophils. *Allergy* 49: 861-865, 1994.
73. **Garcia-Barcina M, Lukomska B, Gawron W, Winnock M, Vidal-Vanaclocha F, Bioulac-Sage P, Balabaud C, and Olszewski W.** Expression of cell adhesion molecules on liver-associated lymphocytes and their ligands on sinusoidal lining cells in patients with benign or malignant liver disease. *Am J Pathol* 146: 1406-1413, 1995.
74. **Gary R and Bretscher A.** Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell* 6: 1061-1075, 1995.
75. **Gary R and Bretscher A.** Heterotypic and homotypic associations between ezrin and moesin, two putative membrane-cytoskeletal linking proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10846-10850, 1993.

76. **Gautreau A, Louvard D, and Arpin M.** Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. *J Cell Biol* 150: 193-203, 2000.
77. **Ge S and Pachter JS.** Caveolin-1 knockdown by small interfering RNA suppresses responses to the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 by human astrocytes. *J Biol Chem* 279: 6688-6695, 2004.
78. **Geiger B, Rosen D, and Berke G.** Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol* 95: 137-143, 1982.
79. **Giagulli C, Scarpini E, Ottoboni L, Narumiya S, Butcher EC, Constantin G, and Laudanna C.** RhoA and zeta PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing. *Immunity* 20: 25-35, 2004.
80. **Golub T and Caroni P.** PI(4,5)P<sub>2</sub>-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility. *J Cell Biol* 169: 151-165, 2005.
81. **Gomez-Mouton C, Abad JL, Mira E, Lacalle RA, Gallardo E, Jimenez-Baranda S, Illa I, Bernad A, Mañes S, and Martínez AC.** Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9642-9647, 2001.
82. **Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Mira E, Jimenez-Baranda S, Barber DF, Carrera AC, Martinez AC, and Mañes S.** Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol* 164: 759-768, 2004.
83. **Grabovsky V, Feigelson S, Chen C, Bleijs DA, Peled A, Cinamon G, Baleux F, Arenzana-Seisdedos F, Lapidot T, van Kooyk Y, Lobb RR, and Alon R.** Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med* 192: 495-506, 2000.
84. **Griffiths CE, Railan D, Gallatin WM, and Cooper KD.** The ICAM-3/LFA-1 interaction is critical for epidermal Langerhans cell alloantigen presentation to CD4<sup>+</sup> T cells. *Br J Dermatol* 133: 823-829, 1995.
85. **Guha S, Rey O, and Rozengurt E.** Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res* 62: 1632-1640, 2002.
86. **Guinamard R, Signoret N, Ishiai M, Marsh M, Kurosaki T, and Ravetch JV.** B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1alpha chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *J Exp Med* 189: 1461-1466, 1999.
87. **Hamada K, Shimizu T, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S, and Hakoshima T.** Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *Embo J* 22: 502-514, 2003.
88. **Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, and Proudfoot AE.** Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem* 74: 385-410, 2005.
89. **Hanks SK.** Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol* 4: 111, 2003.
90. **Harris J, Werling D, Hope JC, Taylor G, and Howard CJ.** Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions. *Trends Immunol* 23: 158-164, 2002.
91. **Harris J, Werling D, Koss M, Monaghan P, Taylor G, and Howard CJ.** Expression of caveolin by bovine lymphocytes and antigen-presenting cells. *Immunology* 105: 190-195, 2002.
92. **Hatanaka M, Maeda T, Ikemoto T, Mori H, Seya T, and Shimizu A.** Expression of caveolin-1 in human T cell leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 382-387, 1998.
93. **Hauss P, Selz F, Cavazzana-Calvo M, and Fischer A.** Characteristics of antigen-independent and antigen-dependent interaction of dendritic cells with CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 25: 2285-2294, 1995.
94. **Hausser A, Storz P, Link G, Stoll H, Liu YC, Altman A, Pfizenmaier K, and Johannes FJ.** Protein kinase C mu is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins. *J Biol Chem* 274: 9258-9264, 1999.

95. **Haworth RS, Goss MW, Rozengurt E, and Avkiran M.** Expression and activity of protein kinase D/protein kinase C  $\mu$  in myocardium: evidence for  $\alpha$ 1-adrenergic receptor- and protein kinase C-mediated regulation. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1013-1023, 2000.
96. **Hayashi A, Seki N, Hattori A, Kozuma S, and Saito T.** PKC $\eta$ , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC $\mu$ . *Biochim Biophys Acta* 1450: 99-106, 1999.
97. **Hayflick JS, Kilgannon P, and Gallatin WM.** The intercellular adhesion molecule (ICAM) family of proteins. New members and novel functions. *Immunol Res* 17: 313-327, 1998.
98. **Hayflick JS, Stine J, Fox R, Hoekstra D, and Gallatin WM.** Functional mapping of the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 reveals important roles for serine residues. *J Biol Chem* 272: 22207-22214, 1997.
99. **Heiska L, Alftan K, Gronholm M, Vilja P, Vaheri A, and Carpen O.** Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem* 273: 21893-21900, 1998.
100. **Hernández-Caselles T, Rubio G, Campanero MR, del Pozo MA, Muro M, Sánchez-Madrid F, and Aparicio P.** ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes. *Eur J Immunol* 23: 2799-2806, 1993.
101. **Hogg N, Laschinger M, Giles K, and McDowall A.** T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci* 116: 4695-4705, 2003.
102. **Holland IB and Blight MA.** ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 293: 381-399, 1999.
103. **Huang L, Wong TY, Lin RC, and Furthmayr H.** Replacement of threonine 558, a critical site of phosphorylation of moesin in vivo, with aspartate activates F-actin binding of moesin. Regulation by conformational change. *J Biol Chem* 274: 12803-12810, 1999.
104. **Hueber AO, Bernard AM, Herincs Z, Couzinet A, and He HT.** An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep* 3: 190-196, 2002.
105. **Hutti JE, Jarrell ET, Chang JD, Abbott DW, Storz P, Toker A, Cantley LC, and Turk BE.** A rapid method for determining protein kinase phosphorylation specificity. *Nat Methods* 1: 27-29, 2004.
106. **Huynh QK and McKinsey TA.** Protein kinase D directly phosphorylates histone deacetylase 5 via a random sequential kinetic mechanism. *Arch Biochem Biophys* 450: 141-148, 2006.
107. **Iglesias T, Cabrera-Poch N, Mitchell MP, Naven TJ, Rozengurt E, and Schiavo G.** Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* 275: 40048-40056, 2000.
108. **Iglesias T and Rozengurt E.** Protein kinase D activation by deletion of its cysteine-rich motifs. *FEBS Lett* 454: 53-56, 1999.
109. **Iglesias T and Rozengurt E.** Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 273: 410-416, 1998.
110. **Iglesias T, Waldron RT, and Rozengurt E.** Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation. *J Biol Chem* 273: 27662-27667, 1998.
111. **Irie A, Harada K, Tsukamoto H, Kim JR, Araki N, and Nishimura Y.** Protein kinase D2 contributes to either IL-2 promoter regulation or induction of cell death upon TCR stimulation depending on its activity in Jurkat cells. *Int Immunol* 18: 1737-1747, 2006.
112. **Itoh K, Sakakibara M, Yamasaki S, Takeuchi A, Arase H, Miyazaki M, Nakajima N, Okada M, and Saito T.** Cutting edge: negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp-EBP50-ERM assembly. *J Immunol* 168: 541-544, 2002.
113. **Ivetic A and Ridley AJ.** Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology* 112: 165-176, 2004.
114. **Jacobelli J, Andres PG, Boisvert J, and Krummel MF.** New views of the immunological synapse: variations in assembly and function. *Curr Opin Immunol* 16: 345-352, 2004.

115. **Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, Wheelock MJ, Johnson KR, Hemstreet GP, and Balaji KC.** E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer Res* 65: 483-492, 2005.
116. **Jamora C, Yamanouye N, Van Lint J, Laudenslager J, Vandenheede JR, Faulkner DJ, and Malhotra V.** Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell* 98: 59-68, 1999.
117. **Jiao X, Zhang N, Xu X, Oppenheim JJ, and Jin T.** Ligand-induced partitioning of human CXCR1 chemokine receptors with lipid raft microenvironments facilitates G-protein-dependent signaling. *Mol Cell Biol* 25: 5752-5762, 2005.
118. **Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, and Pfizenmaier K.** PKC $\epsilon$  is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 269: 6140-6148, 1994.
119. **Juan M, Vinas O, Pino-Otin MR, Places L, Martinez-Caceres E, Barcelo JJ, Miralles A, Vilella R, de la Fuente MA, Vives J, and et al.** CD50 (intercellular adhesion molecule 3) stimulation induces calcium mobilization and tyrosine phosphorylation through p59fyn and p56lck in Jurkat T cell line. *J Exp Med* 179: 1747-1756, 1994.
120. **Kabouridis PS, Janzen J, Magee AL, and Ley SC.** Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30: 954-963, 2000.
121. **Katagiri K, Hattori M, Minato N, Irie S, Takatsu K, and Kinashi T.** Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol Cell Biol* 20: 1956-1969, 2000.
122. **Katagiri K, Imamura M, and Kinashi T.** Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. *Nat Immunol* 7: 919-928, 2006.
123. **Katagiri K, Maeda A, Shimonaka M, and Kinashi T.** RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol* 4: 741-748, 2003.
124. **Katagiri K, Ohnishi N, Kabashima K, Iyoda T, Takeda N, Shinkai Y, Inaba K, and Kinashi T.** Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 5: 1045-1051, 2004.
125. **Katagiri K, Shimonaka M, and Kinashi T.** Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C- $\gamma$ 1. *J Biol Chem* 279: 11875-11881, 2004.
126. **Kazanietz MG.** Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol* 61: 759-767, 2002.
127. **Kennett SB, Roberts JD, and Olden K.** Requirement of protein kinase C micro activation and calpain-mediated proteolysis for arachidonic acid-stimulated adhesion of MDA-MB-435 human mammary carcinoma cells to collagen type IV. *J Biol Chem* 279: 3300-3307, 2004.
128. **Kessel JM, Hayflick J, Weyrich AS, Hoffman PA, Gallatin M, McIntyre TM, Prescott SM, and Zimmerman GA.** Coengagement of ICAM-3 and Fc receptors induces chemokine secretion and spreading by myeloid leukocytes. *J Immunol* 160: 5579-5587, 1998.
129. **Kinashi T.** Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 5: 546-559, 2005.
130. **Klein R.** Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 16: 580-589, 2004.
131. **Klickstein LB, York MR, Fougerolles AR, and Springer TA.** Localization of the binding site on intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *J Biol Chem* 271: 23920-23927, 1996.
132. **Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, and Chao MV.** An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci* 21: 176-185, 2001.
133. **Kovalevska LM, Yurchenko OV, Shlapatska LM, Berdova GG, Mikhalap SV, Van Lint J, and Sidorenko SP.** Immunohistochemical studies of protein kinase D (PKD) 2 expression in malignant human lymphomas. *Exp Oncol* 28: 225-230, 2006.

134. **Krummel MF and Davis MM.** Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol* 14: 66-74, 2002.
135. **Kumar A, Humphreys TD, Kremer KN, Bramati PS, Bradfield L, Edgar CE, and Hedin KE.** CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity* 25: 213-224, 2006.
136. **Kupfer A, Swain SL, Janeway CA, Jr., and Singer SJ.** The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6080-6083, 1986.
137. **Kupfer H, Monks CR, and Kupfer A.** Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. *J Exp Med* 179: 1507-1515, 1994.
138. **Laudanna C, Campbell JJ, and Butcher EC.** Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 271: 981-983, 1996.
139. **Lawson MA and Maxfield FR.** Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377: 75-79, 1995.
140. **Le Bras S, Foucault I, Foussat A, Brignone C, Acuto O, and Deckert M.** Recruitment of the actin-binding protein HIP-55 to the immunological synapse regulates T cell receptor signaling and endocytosis. *J Biol Chem* 279: 15550-15560, 2004.
141. **Lee JH, Katakai T, Hara T, Gonda H, Sugai M, and Shimizu A.** Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *J Cell Biol* 167: 327-337, 2004.
142. **Lemmon MA.** Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 4: 201-213, 2003.
143. **Lemonnier J, Ghayor C, Guicheux J, and Caverzasio J.** Protein kinase C-independent activation of protein kinase D is involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. *J Biol Chem* 279: 259-264, 2004.
144. **Li J, O'Connor KL, Hellmich MR, Greeley GH, Jr., Townsend CM, Jr., and Evers BM.** The role of protein kinase D in neurotensin secretion mediated by protein kinase C-alpha/-delta and Rho/Rho kinase. *J Biol Chem* 279: 28466-28474, 2004.
145. **Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J, and Malhotra V.** Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 104: 409-420, 2001.
146. **Lorant DE, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Prescott SM, and Zimmerman GA.** Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surfaces. *J Clin Invest* 96: 171-182, 1995.
147. **Lozano F, Alberola-Ila J, Places L, and Vives J.** Effect of protein kinase C activators on the phosphorylation and the surface expression of the CDw50 leukocyte antigen. *Eur J Biochem* 203: 321-326, 1992.
148. **Lu Q, Sun EE, Klein RS, and Flanagan JG.** Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* 105: 69-79, 2001.
149. **Ludford-Menting MJ, Oliaro J, Sacirbegovic F, Cheah ET, Pedersen N, Thomas SJ, Pasam A, Iazzolino R, Dow LE, Waterhouse NJ, Murphy A, Ellis S, Smyth MJ, Kershaw MH, Darcy PK, Humbert PO, and Russell SM.** A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* 22: 737-748, 2005.
150. **Luo B, Prescott SM, and Topham MK.** Association of diacylglycerol kinase zeta with protein kinase C alpha: spatial regulation of diacylglycerol signaling. *J Cell Biol* 160: 929-937, 2003.
151. **Luo B, Prescott SM, and Topham MK.** Protein kinase C alpha phosphorylates and negatively regulates diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* 278: 39542-39547, 2003.
152. **Luo B, Regier DS, Prescott SM, and Topham MK.** Diacylglycerol kinases. *Cell Signal* 16: 983-989, 2004.
153. **Luo C, Pan H, Mines M, Watson K, Zhang J, and Fan GH.** CXCL12 induces tyrosine phosphorylation of cortactin, which plays a role in CXC chemokine receptor 4-mediated extracellular signal-regulated kinase activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 281: 30081-30093, 2006.

154. **Luo S, Chen Y, Lai KO, Arevalo JC, Froehner SC, Adams ME, Chao MV, and Ip NY.** {alpha}-Syntrophin regulates ARMS localization at the neuromuscular junction and enhances EphA4 signaling in an ARMS-dependent manner. *J Cell Biol* 169: 813-824, 2005.
155. **Luster AD.** Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338: 436-445, 1998.
156. **Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, and Springer TA.** Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9448-9453, 1998.
157. **Maeda Y, Beznoussenko GV, Van Lint J, Mironov AA, and Malhotra V.** Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain. *Embo J* 20: 5982-5990, 2001.
158. **Mañes S and Viola A.** Lipid rafts in lymphocyte activation and migration. *Mol Membr Biol* 23: 59-69, 2006.
159. **Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, and Sudarsanam S.** The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934, 2002.
160. **Marklund U, Lightfoot K, and Cantrell D.** Intracellular location and cell context-dependent function of protein kinase D. *Immunity* 19: 491-501, 2003.
161. **Marshall CJ.** Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179-185, 1995.
162. **Martin S, Rieckmann P, Melchers I, Wagner R, Bertrams J, Voskuyl AE, Roep BO, Zielasek J, Heidenthal E, Weichselbraun I, and et al.** Circulating forms of ICAM-3 (cICAM-3). Elevated levels in autoimmune diseases and lack of association with cICAM-1. *J Immunol* 154: 1951-1955, 1995.
163. **Marwali MR, Rey-Ladino J, Dreolini L, Shaw D, and Takei F.** Membrane cholesterol regulates LFA-1 function and lipid raft heterogeneity. *Blood* 102: 215-222, 2003.
164. **Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S, and Tsukita S.** Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140: 647-657, 1998.
165. **Matsui T, Yonemura S, Tsukita S, and Tsukita S.** Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* 9: 1259-1262, 1999.
166. **Matthews S, Iglesias T, Cantrell D, and Rozengurt E.** Dynamic re-distribution of protein kinase D (PKD) as revealed by a GFP-PKD fusion protein: dissociation from PKD activation. *FEBS Lett* 457: 515-521, 1999.
167. **Matthews SA and Cantrell DA.** The role of serine/threonine kinases in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 18: 314-320, 2006.
168. **Matthews SA, Dayalu R, Thompson LJ, and Scharenberg AM.** Regulation of protein kinase C $\eta$  by the B-cell antigen receptor. *J Biol Chem* 278: 9086-9091, 2003.
169. **Matthews SA, Iglesias T, Rozengurt E, and Cantrell D.** Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD). *Embo J* 19: 2935-2945, 2000.
170. **Matthews SA, Liu P, Spitaler M, Olson EN, McKinsey TA, Cantrell DA, and Scharenberg AM.** Essential role for protein kinase D family kinases in the regulation of class II histone deacetylases in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 26: 1569-1577, 2006.
171. **Matthews SA, Pettit GR, and Rozengurt E.** Bryostatins induce biphasic activation of protein kinase D in intact cells. *J Biol Chem* 272: 20245-20250, 1997.
172. **Matthews SA, Rozengurt E, and Cantrell D.** Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase C $\mu$ . *J Biol Chem* 274: 26543-26549, 1999.
173. **Matthews SA, Rozengurt E, and Cantrell D.** Protein kinase D. A selective target for antigen receptors and a downstream target for protein kinase C in lymphocytes. *J Exp Med* 191: 2075-2082, 2000.
174. **McGraw TP, Folds JD, Whisnant JK, Phillips TM, and Stass SA.** A defect in the formation of uropod-bearing lymphocytes (hand-mirror cells) in patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Am J Hematol* 10: 157-163, 1981.

175. **McLeod SJ, Li AH, Lee RL, Burgess AE, and Gold MR.** The Rap GTPases regulate B cell migration toward the chemokine stromal cell-derived factor-1 (CXCL12): potential role for Rap2 in promoting B cell migration. *J Immunol* 169: 1365-1371, 2002.
176. **Medeiros RB, Dickey DM, Chung H, Quale AC, Nagarajan LR, Billadeau DD, and Shimizu Y.** Protein kinase D1 and the beta 1 integrin cytoplasmic domain control beta 1 integrin function via regulation of Rap1 activation. *Immunity* 23: 213-226, 2005.
177. **Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de Ana A, Jones DR, Toran JL, and Martínez AC.** Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *Embo J* 20: 2497-2507, 2001.
178. **Mihailovic T, Marx M, Auer A, Van Lint J, Schmid M, Weber C, and Seufferlein T.** Protein kinase D2 mediates activation of nuclear factor kappaB by Bcr-Abl in Bcr-Abl+ human myeloid leukemia cells. *Cancer Res* 64: 8939-8944, 2004.
179. **Miletic AV, Swat M, Fujikawa K, and Swat W.** Cytoskeletal remodeling in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 15: 261-268, 2003.
180. **Millan J, Montoya MC, Sancho D, Sánchez-Madrid F, and Alonso MA.** Lipid rafts mediate biosynthetic transport to the T lymphocyte uropod subdomain and are necessary for uropod integrity and function. *Blood* 99: 978-984, 2002.
181. **Miller MJ, Wei SH, Cahalan MD, and Parker I.** Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2604-2609, 2003.
182. **Minami Y, Samelson LE, and Klausner RD.** Internalization and cycling of the T cell antigen receptor. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 262: 13342-13347, 1987.
183. **Molon B, Gri G, Bettella M, Gomez-Mouton C, Lanzavecchia A, Martínez AC, Mañes S, and Viola A.** T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6: 465-471, 2005.
184. **Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, and Kupfer A.** Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395: 82-86, 1998.
185. **Montoya MC, Sancho D, Bonello G, Collette Y, Langlet C, He HT, Aparicio P, Alcover A, Olive D, and Sánchez-Madrid F.** Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol* 3: 159-168, 2002.
186. **Montoya MC, Sancho D, Vicente-Manzanares M, and Sánchez-Madrid F.** Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 186: 68-82, 2002.
187. **Morgan MM, Labno CM, Van Seventer GA, Denny MF, Straus DB, and Burkhardt JK.** Superantigen-induced T cell:B cell conjugation is mediated by LFA-1 and requires signaling through Lck, but not ZAP-70. *J Immunol* 167: 5708-5718, 2001.
188. **Moser B, Wolf M, Walz A, and Loetscher P.** Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25: 75-84, 2004.
189. **Mullin MJ, Lightfoot K, Marklund U, and Cantrell DA.** Differential requirement for RhoA GTPase depending on the cellular localization of protein kinase D. *J Biol Chem* 281: 25089-25096, 2006.
190. **Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, and Richmond A.** Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 637-658, 2005.
191. **Ng T, Parsons M, Hughes WE, Monypenny J, Zicha D, Gautreau A, Arpin M, Gschmeissner S, Verveer PJ, Bastiaens PI, and Parker PJ.** Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *Embo J* 20: 2723-2741, 2001.
192. **Nguyen DH and Taub D.** CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *J Immunol* 168: 4121-4126, 2002.
193. **Niggemann B, Maaser K, Lu H, Kroczeck R, Zanker KS, and Friedl P.** Locomotory phenotypes of human tumor cell lines and T lymphocytes in a three-dimensional collagen lattice. *Cancer Lett* 118: 173-180, 1997.
194. **Nishikawa K, Toker A, Johannes FJ, Songyang Z, and Cantley LC.** Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem* 272: 952-960, 1997.
195. **Oancea E, Bezzerides VJ, Greka A, and Clapham DE.** Mechanism of persistent protein kinase D1 translocation and activation. *Dev Cell* 4: 561-574, 2003.



196. **Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, and Moser B.** The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382: 833-835, 1996.
197. **Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, and Weinberg RA.** Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121: 335-348, 2005.
198. **Orsini MJ, Parent JL, Mundell SJ, Benovic JL, and Marchese A.** Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem* 274: 31076-31086, 1999.
199. **Palmantier R, George MD, Akiyama SK, Wolber FM, Olden K, and Roberts JD.** Cis-polyunsaturated fatty acids stimulate beta1 integrin-mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type IV collagen by activating protein kinases C-epsilon and -mu. *Cancer Res* 61: 2445-2452, 2001.
200. **Paolucci L and Rozengurt E.** Protein kinase D in small cell lung cancer cells: rapid activation through protein kinase C. *Cancer Res* 59: 572-577, 1999.
201. **Parlato S, Giammarioli AM, Logozzi M, Lozupone F, Matarrese P, Luciani F, Falchi M, Malorni W, and Fais S.** CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *Embo J* 19: 5123-5134, 2000.
202. **Parra M, Kasler H, McKinsey TA, Olson EN, and Verdin E.** Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *J Biol Chem* 280: 13762-13770, 2005.
203. **Parton RG.** Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* 8: 542-548, 1996.
204. **Patey N, Vazeux R, Canioni D, Potter T, Gallatin WM, and Brousse N.** Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells. Expression in tumors but not in inflammatory responses. *Am J Pathol* 148: 465-472, 1996.
205. **Peacock JW and Jirik FR.** TCR activation inhibits chemotaxis toward stromal cell-derived factor-1: evidence for reciprocal regulation between CXCR4 and the TCR. *J Immunol* 162: 215-223, 1999.
206. **Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, and Karplus PA.** Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101: 259-270, 2000.
207. **Perez OD, Mitchell D, Jager GC, South S, Murriel C, McBride J, Herzenberg LA, Kinoshita S, and Nolan GP.** Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nat Immunol* 4: 1083-1092, 2003.
208. **Pietromonaco SF, Simons PC, Altman A, and Elias L.** Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem* 273: 7594-7603, 1998.
209. **Prestle J, Pfizenmaier K, Brenner J, and Johannes FJ.** Protein kinase C mu is located at the Golgi compartment. *J Cell Biol* 134: 1401-1410, 1996.
210. **Prigozhina NL and Waterman-Storer CM.** Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Curr Biol* 14: 88-98, 2004.
211. **Qin L, Zeng H, and Zhao D.** Requirement of Protein Kinase D Tyrosine Phosphorylation for VEGF-A165-induced Angiogenesis through Its Interaction and Regulation of Phospholipase C{gamma} Phosphorylation. *J Biol Chem* 281: 32550-32558, 2006.
212. **Rao Y, Wong K, Ward M, Jurgensen C, and Wu JY.** Neuronal migration and molecular conservation with leukocyte chemotaxis. *Genes Dev* 16: 2973-2984, 2002.
213. **Ratner S, Sherrod WS, and Lichlyter D.** Microtubule retraction into the uropod and its role in T cell polarization and motility. *J Immunol* 159: 1063-1067, 1997.
214. **Reczek D, Berryman M, and Bretscher A.** Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* 139: 169-179, 1997.

215. **Rey O, Papazyan R, Waldron RT, Young SH, Lippincott-Schwartz J, Jacamo R, and Rozengurt E.** The nuclear import of protein kinase D3 requires its catalytic activity. *J Biol Chem* 281: 5149-5157, 2006.
216. **Rey O, Sinnott-Smith J, Zhukova E, and Rozengurt E.** Regulated nucleocytoplasmic transport of protein kinase D in response to G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 276: 49228-49235, 2001.
217. **Rey O, Young SH, Cantrell D, and Rozengurt E.** Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation. Dependence on protein kinase C. *J Biol Chem* 276: 32616-32626, 2001.
218. **Rey O, Yuan J, and Rozengurt E.** Intracellular redistribution of protein kinase D2 in response to G-protein-coupled receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 302: 817-824, 2003.
219. **Rey O, Yuan J, Young SH, and Rozengurt E.** Protein kinase C  $\alpha$ /protein kinase D3 nuclear localization, catalytic activation, and intracellular redistribution in response to G protein-coupled receptor agonists. *J Biol Chem* 278: 23773-23785, 2003.
220. **Rey O, Zhukova E, Sinnott-Smith J, and Rozengurt E.** Vasopressin-induced intracellular redistribution of protein kinase D in intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 196: 483-492, 2003.
221. **Riol-Blanco L, Iglesias T, Sánchez-Sánchez N, de la Rosa G, Sánchez-Ruiloba L, Cabrera-Poch N, Torres A, Longo I, Garcia-Bordas J, Longo N, Tejedor A, Sánchez-Mateos P, and Rodríguez-Fernández JL.** The neuronal protein Kidins220 localizes in a raft compartment at the leading edge of motile immature dendritic cells. *Eur J Immunol* 34: 108-118, 2004.
222. **Rodgers W, Farris D, and Mishra S.** Merging complexes: properties of membrane raft assembly during lymphocyte signaling. *Trends Immunol* 26: 97-103, 2005.
223. **Rodríguez-Fernández JL, Gomez M, Luque A, Hogg N, Sánchez-Madrid F, and Cabanas C.** The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 10: 1891-1907, 1999.
224. **Rodríguez-Fernández JL, Sánchez-Martin L, Rey M, Vicente-Manzanares M, Narumiya S, Teixido J, Sánchez-Madrid F, and Cabanas C.** Rho and Rho-associated kinase modulate the tyrosine kinase PYK2 in T-cells through regulation of the activity of the integrin LFA-1. *J Biol Chem* 276: 40518-40527, 2001.
225. **Roland J, Murphy BJ, Ahr B, Robert-Hebmann V, Delauzun V, Nye KE, Devaux C, and Biard-Piechaczyk M.** Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* 101: 399-406, 2003.
226. **Rosenman SJ, Ganji AA, Tedder TF, and Gallatin WM.** Syn-capping of human T lymphocyte adhesion/activation molecules and their redistribution during interaction with endothelial cells. *J Leukoc Biol* 53: 1-10, 1993.
227. **Roumier A, Olivo-Marin JC, Arpin M, Michel F, Martin M, Mangeat P, Acuto O, Dautry-Varsat A, and Alcover A.** The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity* 15: 715-728, 2001.
228. **Rozengurt E, Rey O, and Waldron RT.** Protein kinase D signaling. *J Biol Chem* 280: 13205-13208, 2005.
229. **Rykx A, De Kimpe L, Mikhalap S, Vantus T, Seufferlein T, Vandenheede JR, and Van Lint J.** Protein kinase D: a family affair. *FEBS Lett* 546: 81-86, 2003.
230. **Salvucci O, de la Luz Sierra M, Martina JA, McCormick PJ, and Tosato G.** EphB2 and EphB4 receptors forward signaling promotes SDF-1-induced endothelial cell chemotaxis and branching remodeling. *Blood* 108: 2914-2922, 2006.
231. **Sampath R, Gallagher PJ, and Pavalko FM.** Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin  $\beta$ 2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and  $\alpha$ -actinin. *J Biol Chem* 273: 33588-33594, 1998.
232. **Sánchez-Madrid F and del Pozo MA.** Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* 18: 501-511, 1999.

233. **Sánchez-Ruiloba L, Cabrera-Poch N, Rodríguez-Martínez M, López-Menendez C, Jean-Mairet RM, Higuero AM, and Iglesias T.** Protein kinase D intracellular localization and activity control kinase D-interacting substrate of 220-kDa traffic through a postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens-1-binding motif. *J Biol Chem* 281: 18888-18900, 2006.
234. **Sancho D, Vicente-Manzanares M, Mittelbrunn M, Montoya MC, Gordon-Alonso M, Serrador JM, and Sánchez-Madrid F.** Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunol Rev* 189: 84-97, 2002.
235. **Sebzda E, Bracke M, Tugal T, Hogg N, and Cantrell DA.** Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. *Nat Immunol* 3: 251-258, 2002.
236. **Sedgwick SG and Smerdon SJ.** The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci* 24: 311-316, 1999.
237. **Serrador JM, Alonso-Lebrero JL, del Pozo MA, Furthmayr H, Schwartz-Albiez R, Calvo J, Lozano F, and Sánchez-Madrid F.** Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol* 138: 1409-1423, 1997.
238. **Serrador JM, Nieto M, Alonso-Lebrero JL, del Pozo MA, Calvo J, Furthmayr H, Schwartz-Albiez R, Lozano F, Gonzalez-Amaro R, Sánchez-Mateos P, and Sánchez-Madrid F.** CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 91: 4632-4644, 1998.
239. **Serrador JM, Nieto M, and Sánchez-Madrid F.** Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol* 9: 228-233, 1999.
240. **Serrador JM, Vicente-Manzanares M, Calvo J, Barreiro O, Montoya MC, Schwartz-Albiez R, Furthmayr H, Lozano F, and Sánchez-Madrid F.** A novel serine-rich motif in the intercellular adhesion molecule 3 is critical for its ezrin/radixin/moesin-directed subcellular targeting. *J Biol Chem* 277: 10400-10409, 2002.
241. **Shamri R, Grabovsky V, Gauguier JM, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W, Robinson MK, Staunton DE, von Andrian UH, and Alon R.** Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol* 6: 497-506, 2005.
242. **Sharfe N, Freywald A, Toro A, Dadi H, and Roifman C.** Ephrin stimulation modulates T cell chemotaxis. *Eur J Immunol* 32: 3745-3755, 2002.
243. **Shaw AS.** FERMin'g up the synapse. *Immunity* 15: 683-686, 2001.
244. **Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, and Kinashi T.** Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol* 161: 417-427, 2003.
245. **Sidorenko SP, Law CL, Klaus SJ, Chandran KA, Takata M, Kurosaki T, and Clark EA.** Protein kinase C mu (PKC mu) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling. *Immunity* 5: 353-363, 1996.
246. **Signoret N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Holmes W, Dallas W, Luther MA, Wells TN, Hoxie JA, and Marsh M.** Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol* 139: 651-664, 1997.
247. **Signoret N, Rosenkilde MM, Klasse PJ, Schwartz TW, Malim MH, Hoxie JA, and Marsh M.** Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *J Cell Sci* 111 (Pt 18): 2819-2830, 1998.
248. **Simons PC, Pietromonaco SF, Reczek D, Bretscher A, and Elias L.** C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 561-565, 1998.
249. **Skubitz KM, Ahmed K, Campbell KD, and Skubitz AP.** CD50 (ICAM-3) is phosphorylated on tyrosine and is associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Immunol* 154: 2888-2895, 1995.

250. **Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, and Lisanti MP.** Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304, 1999.
251. **Smith A, Bracke M, Leitinger B, Porter JC, and Hogg N.** LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci* 116: 3123-3133, 2003.
252. **Smith A, Carrasco YR, Stanley P, Kieffer N, Batista FD, and Hogg N.** A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol* 170: 141-151, 2005.
253. **Soede RD, Driessens MH, Ruuls-Van Stalle L, Van Hulten PE, Brink A, and Roos E.** LFA-1 to LFA-1 signals involve zeta-associated protein-70 (ZAP-70) tyrosine kinase: relevance for invasion and migration of a T cell hybridoma. *J Immunol* 163: 4253-4261, 1999.
254. **Soede RD, Zeelenberg IS, Wijnands YM, Kamp M, and Roos E.** Stromal cell-derived factor-1-induced LFA-1 activation during in vivo migration of T cell hybridoma cells requires Gq/11, RhoA, and myosin, as well as Gi and Cdc42. *J Immunol* 166: 4293-4301, 2001.
255. **Spitaler M and Cantrell DA.** Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* 5: 785-790, 2004.
256. **Spitaler M, Emslie E, Wood CD, and Cantrell D.** Diacylglycerol and protein kinase D localization during T lymphocyte activation. *Immunity* 24: 535-546, 2006.
257. **Stafford MJ, Watson SP, and Pears CJ.** PKD: a new protein kinase C-dependent pathway in platelets. *Blood* 101: 1392-1399, 2003.
258. **Staquet MJ, Peguet J, Jacquet C, Dezutter-Dambuyant C, and Schmitt D.** Expression of ICAM-3 on human epidermal dendritic cells. *Immunobiology* 192: 249-261, 1995.
259. **Starling GC, McLellan AD, Egner W, Sorg RV, Fawcett J, Simmons DL, and Hart DN.** Intercellular adhesion molecule-3 is the predominant co-stimulatory ligand for leukocyte function antigen-1 on human blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 25: 2528-2532, 1995.
260. **Storz P.** Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell Biol* 17: 13-18, 2007.
261. **Storz P, Doppler H, Johannes FJ, and Toker A.** Tyrosine phosphorylation of protein kinase D in the pleckstrin homology domain leads to activation. *J Biol Chem* 278: 17969-17976, 2003.
262. **Storz P, Doppler H, and Toker A.** Activation loop phosphorylation controls protein kinase D-dependent activation of nuclear factor kappaB. *Mol Pharmacol* 66: 870-879, 2004.
263. **Storz P, Doppler H, and Toker A.** Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. *Mol Cell Biol* 24: 2614-2626, 2004.
264. **Storz P, Hausser A, Link G, Dedio J, Ghebrehwet B, Pfizenmaier K, and Johannes FJ.** Protein kinase C [micro] is regulated by the multifunctional chaperon protein p32. *J Biol Chem* 275: 24601-24607, 2000.
265. **Storz P and Toker A.** Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *Embo J* 22: 109-120, 2003.
266. **Sturany S, Van Lint J, Muller F, Wilda M, Hameister H, Hocker M, Brey A, Gern U, Vandenheede J, Gress T, Adler G, and Seufferlein T.** Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases. *J Biol Chem* 276: 3310-3318, 2001.
267. **Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, Annes J, Petrzilka D, Kupfer A, Schwartzberg PL, and Littman DR.** PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404: 402-407, 2000.
268. **Szabo MC, Butcher EC, McIntyre BW, Schall TJ, and Bacon KB.** RANTES stimulation of T lymphocyte adhesion and activation: role for LFA-1 and ICAM-3. *Eur J Immunol* 27: 1061-1068, 1997.
269. **Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, and Nagasawa T.** The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393: 591-594, 1998.

270. **Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, and Calderwood DA.** Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302: 103-106, 2003.
271. **Tan SL and Parker PJ.** Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem J* 376: 545-552, 2003.
272. **Teixeira C, Stang SL, Zheng Y, Beswick NS, and Stone JC.** Integration of DAG signaling systems mediated by PKC-dependent phosphorylation of RasGRP3. *Blood* 102: 1414-1420, 2003.
273. **Thelen M.** Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2: 129-134, 2001.
274. **Thrasher AJ, Burns S, Lorenzi R, and Jones GE.** The Wiskott-Aldrich syndrome: disordered actin dynamics in haematopoietic cells. *Immunol Rev* 178: 118-128, 2000.
275. **Tohyama Y, Katagiri K, Pardi R, Lu C, Springer TA, and Kinashi T.** The critical cytoplasmic regions of the alphaL/beta2 integrin in Rap1-induced adhesion and migration. *Mol Biol Cell* 14: 2570-2582, 2003.
276. **Tomas EM, Chau TA, and Madrenas J.** Clustering of a lipid-raft associated pool of ERM proteins at the immunological synapse upon T cell receptor or CD28 ligation. *Immunol Lett* 83: 143-147, 2002.
277. **Tran PB and Miller RJ.** Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci* 4: 444-455, 2003.
278. **Tsuji Y, Hatanaka M, Maeda T, Seya T, Takenaka H, and Shimizu A.** Differential-expression and tyrosine-phosphorylation profiles of caveolin isoforms in human T cell leukemia cell lines. *Int J Mol Med* 16: 889-893, 2005.
279. **Tsuji Y, Nakagawa T, Hatanaka M, Takeuchi T, Matsumoto E, Takenaka H, and Shimizu A.** Quantification of caveolin isoforms using quantitative real-time RT-PCR, and analysis of promoter CpG methylation of caveolin-1alpha in human T cell leukemia cell lines. *Int J Mol Med* 18: 489-495, 2006.
280. **Valverde AM, Sinnott-Smith J, Van Lint J, and Rozengurt E.** Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8572-8576, 1994.
281. **van Buul JD, Voermans C, van Gelderen J, Anthony EC, van der Schoot CE, and Hordijk PL.** Leukocyte-endothelium interaction promotes SDF-1-dependent polarization of CXCR4. *J Biol Chem* 278: 30302-30310, 2003.
282. **Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenheede JR, and Seufferlein T.** Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol* 12: 193-200, 2002.
283. **Van Lint JV, Sinnott-Smith J, and Rozengurt E.** Expression and characterization of PKD, a phorbol ester and diacylglycerol-stimulated serine protein kinase. *J Biol Chem* 270: 1455-1461, 1995.
284. **Vantus T, Vertommen D, Saelens X, Rykx A, De Kimpe L, Vancauwenbergh S, Mikhilap S, Waelkens E, Keri G, Seufferlein T, Vandenabeele P, Rider MH, Vandenheede JR, and Van Lint J.** Doxorubicin-induced activation of protein kinase D1 through caspase-mediated proteolytic cleavage: identification of two cleavage sites by microsequencing. *Cell Signal* 16: 703-709, 2004.
285. **Vazeux R, Hoffman PA, Tomita JK, Dickinson ES, Jasman RL, St John T, and Gallatin WM.** Cloning and characterization of a new intercellular adhesion molecule ICAM-R. *Nature* 360: 485-488, 1992.
286. **Venkatesan S, Rose JJ, Lodge R, Murphy PM, and Foley JF.** Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4. *Mol Biol Cell* 14: 3305-3324, 2003.
287. **Vertommen D, Rider M, Ni Y, Waelkens E, Merlevede W, Vandenheede JR, and Van Lint J.** Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 275: 19567-19576, 2000.
288. **Vicente-Manzanares M, Rey M, Jones DR, Sancho D, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, del Pozo MA, Yanez-Mo M, de Ana AM, Martinez AC, Merida I, and Sánchez-Madrid F.**

- Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *J Immunol* 163: 4001-4012, 1999.
289. **Vicente-Manzanares M and Sánchez-Madrid F.** Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4: 110-122, 2004.
  290. **Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, and Lanzavecchia A.** T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283: 680-682, 1999.
  291. **Volkov Y, Long A, and Kelleher D.** Inside the crawling T cell: leukocyte function-associated antigen-1 cross-linking is associated with microtubule-directed translocation of protein kinase C isoenzymes beta(I) and delta. *J Immunol* 161: 6487-6495, 1998.
  292. **Volkov Y, Long A, McGrath S, Ni Eidhin D, and Kelleher D.** Crucial importance of PKC-beta(I) in LFA-1-mediated locomotion of activated T cells. *Nat Immunol* 2: 508-514, 2001.
  293. **von Essen M, Nielsen MW, Bonefeld CM, Boding L, Larsen JM, Leitges M, Baier G, Odum N, and Geisler C.** Protein kinase C (PKC) alpha and PKC theta are the major PKC isotypes involved in TCR down-regulation. *J Immunol* 176: 7502-7510, 2006.
  294. **Waldron RT, Iglesias T, and Rozengurt E.** The pleckstrin homology domain of protein kinase D interacts preferentially with the eta isoform of protein kinase C. *J Biol Chem* 274: 9224-9230, 1999.
  295. **Waldron RT, Rey O, Iglesias T, Tugal T, Cantrell D, and Rozengurt E.** Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo. *J Biol Chem* 276: 32606-32615, 2001.
  296. **Waldron RT and Rozengurt E.** Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 278: 154-163, 2003.
  297. **Wang QJ.** PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci* 27: 317-323, 2006.
  298. **Ward SG, Bacon K, and Westwick J.** Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 9: 1-11, 1998.
  299. **Wood CD, Marklund U, and Cantrell DA.** Dual phospholipase C/diacylglycerol requirement for protein kinase D1 activation in lymphocytes. *J Biol Chem* 280: 6245-6251, 2005.
  300. **Woods AJ, White DP, Caswell PT, and Norman JC.** PKD1/PKCmu promotes alphavbeta3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *Embo J* 23: 2531-2543, 2004.
  301. **Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, and Burridge K.** RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* 154: 147-160, 2001.
  302. **Wu J and Luo H.** Recent advances on T-cell regulation by receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Hematol* 12: 292-297, 2005.
  303. **Wysoczynski M, Reza R, Ratajczak J, Kucia M, Shirvaikar N, Honczarenko M, Mills M, Wanzeck J, Janowska-Wieczorek A, and Ratajczak MZ.** Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 105: 40-48, 2005.
  304. **Yang W, Wang D, and Richmond A.** Role of clathrin-mediated endocytosis in CXCR2 sequestration, resensitization, and signal transduction. *J Biol Chem* 274: 11328-11333, 1999.
  305. **Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S, and Tsukita S.** Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140: 885-895, 1998.
  306. **Yonemura S, Matsui T, Tsukita S, and Tsukita S.** Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci* 115: 2569-2580, 2002.
  307. **Yuan J, Bae D, Cantrell D, Nel AE, and Rozengurt E.** Protein kinase D is a downstream target of protein kinase C theta. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 444-452, 2002.
  308. **Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, and Tsien RY.** Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296: 913-916, 2002.

309. **Zambruno G, Cossarizza A, Zacchi V, Ottani D, Luppi AM, Giannetti A, and Girolomoni G.** Functional intercellular adhesion molecule-3 is expressed by freshly isolated epidermal Langerhans cells and is not regulated during culture. *J Invest Dermatol* 105: 215-219, 1995.
310. **Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, and Littman DR.** Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393: 595-599, 1998.
311. **Zugaza JL, Sinnott-Smith J, Van Lint J, and Rozengurt E.** Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *Embo J* 15: 6220-6230, 1996.





## **ANEXOS**



**The novel neuronal protein Kidins220 interacts with ICAM-3, ERM proteins and Caveolin-1 at the uropod of polarized T lymphocytes**

**Roberto Martín Jean-Mairet<sup>1</sup>, Celia López-Menéndez<sup>1</sup>, Lorena Riol-Blanco<sup>2</sup>, Paloma Sánchez-Mateos<sup>3</sup>, Francisco Sánchez-Madrid<sup>4</sup>, José Luis Rodríguez-Fernández<sup>2</sup> and Teresa Iglesias<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain



## Summary

The Kinase D interacting substrate of 220 kDa (Kidins220), also known as ankyrin repeat-rich membrane spanning (ARMS), is a novel protein of unknown function that is mainly expressed in brain and other cells of nervous origin. Kidins220 was identified as the first substrate of protein kinase D1 (PKD1) and as an effector of neurotrophin and ephrin receptors. Herein we show that Kidins220 is also expressed in T lymphocytes where is highly concentrated at the uropod of polarized T cells. Kidins220 co-localizes with adhesion molecules clustered in this region, including intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3), CD43 and CD44. Kidins220 also interacts with ICAM-3 and ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins in polarized T cells. Furthermore, Kidins220 is associated to rafts domains in the uropod and interacts with caveolin-1, a molecule that we show here to be expressed in T cells. Disruption of cell polarization by treatments with F-actin-disorganizing drugs or phorbol esters provokes Kidins220 redistribution from the uropod to other cellular regions and drastically impairs its interaction with ICAM-3. Collectively, our findings suggest that Kidins220 may play a major role in the constitution and function of the uropod, which may be important for essential processes of the immune response like the regulation of cell polarity and migration.

## 1 Introduction

Kinase D interacting substrate of 220 kDa (Kidins220, (117), also known as ankyrin repeat-rich membrane spanning, (ARMS, (142), is a novel integral membrane protein of unknown function that presents one single gene in *D. melanogaster*, *C. elegans* and mammals. Kidins220 was cloned from neuroendocrine rat PC12 cells, being identified as the first physiological substrate for protein kinase D1 (PKD1), as well as a downstream effector of neurotrophin and ephrin receptors (117, 142). The primary amino acid sequence of Kidins220 contains several structural and functional domains and diverse motifs that may link this protein to membranes, cytoskeleton and different signaling pathways. The amino-terminus bears eleven ankyrin repeats which are likely to be involved in protein-protein interactions especially with the cytoskeleton (257). Downstream of this motif, the sequence presents four transmembrane domains, a proline-rich region, a splicing cassette with a sterile  $\alpha$  motif or SAM domain (254), and a type I Postsynaptic Density-95/Discs large/Zonula Occludens-1 (PDZ)-binding motif at the very C-terminal end (164, 252).

Kidins220 is predominantly expressed in brain and in neural cells. Neurons present a polarized phenotype and a differential distribution of specific molecules along the surfaces of the dendrites, the cell body and the axonal projection (11, 241). The cytoskeleton plays a crucial role in the segregation and stabilization of many of these molecules to specific cellular subdomains in polarized cells (11, 194). In neural cells, Kidins220 presents a polarized location and concentrates at the tip of extending neurites and axonal growth cones (35, 117, 142).

Resting T lymphocytes are spherical non-polarized cells, but their activation in response to chemoattractant stimuli can trigger morphological and cytoskeletal rearrangements and the acquisition of a polarized morphology, followed by an increase in their ability to migrate and move (190, 260, 314, 315). Activated T lymphocytes migrate long distances to the inflammatory foci and are able to interact with other leukocytes, endothelial cells and antigen-presenting cells (251, 260). Polarized migratory T lymphocytes exhibit a leading edge at the front pole of the cell where dynamic actin

filaments, receptors for antigen and chemokines, and substrate adhesion molecules such as integrins are concentrated and a pseudopod-like, rigid membrane-cytoskeletal protrusion, at the trailing edge, called uropod (36, 37, 204, 207, 208). It has been shown that these two poles, leading edge and uropod, can carry out specialized distinct functions of T cells during the immune response (51, 198, 251).

The lymphocyte uropod projects far from the surface of contact of the cell with the extracellular matrix and clusters within its structure several intercellular adhesion molecules such as intercellular adhesion molecules (ICAMs -1, -2 and -3), CD43, CD44 and P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1) (31, 36, 53, 251). This retractile pole also accumulates lipid rafts enriched in the glycolipid ganglioside GM1 (90, 91, 191), signalling molecules, myosin II, tubulin (231, 251, 260), and members of the ezrin-radixin-moesin (ERM) family of proteins of membrane-actin cytoskeleton linkers (190, 258, 302, 304).

In this study, we have investigated the expression and cellular localization of Kidins220 in polarized migrating T lymphocytes. We have found that Kidins220 is present in polarized T cells where it is highly concentrated at the uropod, and colocalizes with ICAM-3, CD43 and CD44. Importantly, we demonstrate for the first time that different T cells express caveolin-1 at the mRNA and protein levels. Moreover, an interaction of Kidins220 with caveolin-1, ICAM-3 and ERM proteins in polarized T lymphocytes was demonstrated by immunoprecipitation and Western blot analysis. Kidins220-ICAM-3 association correlates with the degree of cell polarity, since treatment with depolarizing stimuli such as F-actin disorganizing drugs or phorbol esters, strongly hampers their interaction. Furthermore, pre-treatment of polarized T lymphocytes with the protein kinase C (PKC) inhibitor GF-I, preserves both cell polarization and the presence of Kidins220-ICAM-3 complexes, indicating the participation of PKC pathways. All together, our findings reveal Kidins220 as an important component of the uropod in polarized T lymphocytes that may be critical for the distribution of specific molecules to the rear end of these cells, and/or in the regulation of their associated functions. Additionally, our results

suggest that Kidins220 could be a key molecule for the formation, maintenance, architecture and role of this protruding structure, and in T cell functions such as polarization, migration and intercellular interactions.

## **2 Results**

### **Kidins220 is expressed in T lymphocytes**

Kidins220 was first identified in neural cells where it is highly expressed (117) (142). We recently discovered that it is also present in cells of the immune system, particularly in human dendritic cells (239). Here, we examined whether Kidins220 was also expressed in T lymphocytes. For that purpose, RT-PCR analysis was carried out using specific pairs of primers to amplify human Kidins220 from cDNAs prepared from primary human T lymphoblasts and the polarized human T cell lines Peer T and HSB2 (Fig. 1A). As positive control we used cDNA obtained from the rat neuroendocrine PC12 cell line, from which Kidins220 was cloned (117) (142). A specific band of 853 bp corresponding to Kidins220 sequence, as assessed by DNA sequencing, was amplified in all cell types, confirming that T lymphocytes express this gene (Fig. 1A). To investigate the presence of Kidins220 at the protein level, 100 µg of total protein from extracts prepared from the same cells mentioned above were analyzed by Western blot using a specific anti-Kidins220 polyclonal antibody. As shown in Fig. 1B, a band of approximately 220 kDa corresponding to Kidins220 was detected in the different T lymphocytes studied. The abundance of this protein in T cells is significantly low when compared to the high content of Kidins220 in extracts from PC12 used as positive control (Fig. 1B, short exposure for PC12 cells, longer exposures for T cells). Pre-absorption of the antiserum with the immunizing peptide completely abolished the recognition of the band, demonstrating its specificity (Fig1B, + blocking peptide).

### **Kidins220 localizes at the uropod of human polarized T lymphocytes.**



We have previously shown that the cellular distribution of Kidins220 in polarized cells is not homogeneous. In neurons and PC12 cells treated with nerve growth factor, Kidins220 is enriched at the tip of growth cones and extending neurites (35, 117, 142), whereas in polarized immature dendritic cells Kidins220 immunostaining is more concentrated at the leading edge (239). Under certain stimuli such as chemokines and some cytokines, peripheral blood T lymphocytes can switch their morphology from a spherical to a polarized shape with the establishment of two different regions: the leading edge and the uropod (315). It was therefore of interest to analyze Kidins220 localization in polarized T cells. We used immunofluorescence and confocal microscopy analysis in order to investigate any alterations in Kidins220 distribution that could occur upon polarization. We first studied Kidins220 immunostaining in primary human proliferative T lymphoblasts, grown in the presence of phytohemagglutinin and interleukin-2, and seeded onto fibronectin-coated coverslips (Fig. 2A). In non-polarized spherical T lymphoblasts, Kidins220 showed a random plasma membrane distribution (Fig. 2A, left panels). Strikingly, and opposite to the phenotype observed in migrating dendritic cells where Kidins220 was more abundant at their leading edges, Kidins220 was drastically redistributed towards the rear end of the cell, to what could constitute the uropod, in the polarized population of T lymphoblasts (Fig. 2A, middle right panel, the uropod is labelled with an arrow head). The localization of Kidins220 in constitutive polarized T cell lines was next investigated. A polarized distribution, enriched at one pole of the cell could be observed, specially at top sections (Fig. 2C, middle panels) in the constitutively polarized human T cell lines Peer and HSB2, suggesting that Kidins220 is concentrated at the protrusion projecting from the cell body or uropod. Pictures corresponding to bottom sections of the cell showed that Kidins220 was also concentrated at some plasma membrane areas and at cell-cell contacts (Fig. 2B, left panels). Until here our results demonstrate that Kidins220 redistributes to what could correspond to the trailing end or uropod of proliferative T lymphoblasts upon polarizing stimuli and that it is enriched at the protruding end in constitutively polarized T cell lines.

In order to better define the region where Kidins220 was concentrating in constitutively polarized T cells and to determine whether this area corresponded to the uropod, we analyzed the co-localization of Kidins220 with different proteins known to cluster within this structure (251). Peer T and HSB2 cells were double-immunostained for Kidins220 and the uropod molecular markers ICAM-3, CD43 and CD44. Kidins220 largely co-localized at the uropod with all the markers assayed in both cell lines (Fig. 3A). CD45, a membrane protein that is not present at the uropod, showed no overlapping with Kidins220 labelling (Fig. 3B). From this experiments we can conclude that Kidins220 localizes at the uropod of polarized motile T cells, suggesting that it could be an important constitutive component of this pole.

#### **Kidins220 concentrates in GM1-enriched lipid rafts at the uropod and interacts with caveolin-1 in polarized T cells.**

Several reports have demonstrated that the uropod accumulates a specific pattern of cholesterol-enriched membrane microdomains or lipid rafts, different from those at the leading edge of polarized T cells, and that preferentially contain a high concentration of the glycolipid ganglioside type-1 or GM-1 (90, 91, 191). These works suggest that raft partitioning is a major determinant for protein redistribution in polarized migrating T cells. In order to determine whether Kidins220 uropod staining was overlapping with these GM1-rich membrane domains in polarized T cells, we carried out an *in vivo* binding assay of Texas Red-conjugated-cholera toxin B (CTB), a method extensively used to detect GM-1 at the plasma membrane (35, 90, 91, 191). Confocal microscopy sections of Peer T cells showed a substantial colocalization of Kidins220 immunostaining and CTB-binding (Fig. 4A). This result indicates the association of Kidins220 with GM-1 enriched lipid rafts at the uropod of polarized T lymphocytes.

Studies with cholesterol-sequestering agents, such as methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCDX), that disrupt membrane rafts, led to the conclusion that cholesterol depletion inhibits cell polarization and migration

in leukocytes (90, 191) (239). We therefore analyzed the effects of MCDX treatment on Kidins220 localization in Peer cells by confocal microscopy. In presence of MCDX, Kidins220 staining is not restricted to a specific region of the cell, showing an even distribution along the plasma membrane of the cells (Fig 4B, +MCDX). This result provides novel evidence indicating that loss of cell polarity may cause a redistribution of Kidins220 out of the rear end specific compartment.

Caveolae are a special type of raft microdomains. They are characteristic invaginations of plasma membrane found in many cell types (272). These structures are organized by caveolins, palmitoylated proteins with high affinity for cholesterol. It is quite widely accepted that caveolae are not present in lymphocytes due to their lack of caveolin expression (112) (226). However, the expression of caveolin-1 in some human T cell leukemia cell lines that show a polarized-activated phenotype has been demonstrated recently by the use of several specific antibodies (101, 300). In order to shed more light on whether T lymphocytes express caveolin-1, we carried out RT-PCR analysis using specific pairs of primers to amplify human caveolin-1 from cDNAs prepared from primary human T lymphoblasts, Jurkat and Peer cells. A specific band of the correct size, 137 bp, was amplified from all samples (Fig. 4C). DNA sequencing of the amplified PCR product confirmed that it corresponded to human caveolin-1 mRNA (Accession number NM\_001753). Western blot analysis of total lysates prepared from the same cell types specified above was used to further confirm the content of caveolin-1 at the protein level (Fig. 4D). A specific anti-caveolin-1 antibody recognized a band of the correct size (22 kDa) and low abundance but detectable in all cells studied. COS-7 and the neuroblastoma cell line N2a were used as positive and negative control for caveolin-1 signal, respectively (4, 213). In summary, these results clearly demonstrate that the T cells studied express caveolin-1 at mRNA and protein level.

Components of lipid rafts, including caveolins, various GPI-anchored proteins, transmembrane proteins and signalling molecules, together with cholesterol and other sphingolipids, are resistant to non-ionic detergent solubilization, (269) and they are easily separated floating after Triton X-100

solubilization and sucrose gradient centrifugation (29). We used this method to study the biochemical association of Kidins220 to lipid rafts in polarized T cells. To this end, Triton X-100 extracts were prepared from Peer cells pre-treated or not with MCDX before isolation of rafts by sucrose gradient centrifugation. Gradient fractionation and Western blot analysis of extracts obtained from untreated Peer cells showed that a significant portion of Kidins220 and caveolin-1 was floating in fraction 3, whereas there was also Kidins220 protein in the soluble fractions 9 and 10 (Fig. 4E). Pre-incubation of the cells with MCDX, provoked the disappearance of Kidins220 and caveolin-1 from the low-density fractions, being present only in more soluble fractions at the bottom of the gradient (Fig. 4E, + MCDX). CD45, a membrane protein excluded from rafts in lymphocytes (191) was only found at the bottom of the gradients (not shown). These results further demonstrate the presence of Kidins220 at lipid rafts in polarized T cells.

The discovery that Kidins220 is enriched in lipid rafts of polarized T lymphocytes and that these cells express caveolin-1, prompted us to examine Kidins220 and caveolin-1 interactions in these cells. To test this possibility, cell lysates from Peer cells were immunoprecipitated with anti-Kidins220 or anti-caveolin-1 antibodies, and the presence of caveolin-1 or Kidins220 in the immunocomplexes, respectively, was assessed by Western blot analysis (Fig. 4F). Caveolin-1 signal was detected in Kidins220 immunoprecipitates (Fig. 4F, lower panel, arrowhead), and accordingly, we found a high amount of Kidins220 in caveolin-1 immunocomplexes (Fig. 4F, upper panel), demonstrating that these two molecules interact in polarized Peer cells.

### **Kidins220 interacts with ICAM-3 and the ERM family of membrane-actin microfilament linkers.**

ICAM-3 has been extensively characterized as a signalling molecule and plays a crucial role in T cell function and immune response (reviewed in (198)). Given the importance of ICAM-3 in T lymphocytes, and although Kidins220 co-localized with several adhesion proteins clustered at the

uropod, we decided to focus our interest on the study of the possible association between Kidins220 and ICAM-3. For that purpose, we carried out co-immunoprecipitation experiments in lysates from Peer and HSB2 cells. Western blot analysis showed that Kidins220 was present in ICAM-3 immunoprecipitates (Fig. 5A). ICAM-3 signal in Kidins220 immunoprecipitates could not be tested since there are no anti-ICAM-3 specific antibodies available to recognize this molecule by Western blot. Our data demonstrate that Kidins220 not only colocalizes (Fig. 3, upper panels) but also interacts with ICAM-3 (Fig. 5A) in the two constitutively polarized T cell lines studied. Importantly, when ICAM-3 was immunoprecipitated from non-polarized Jurkat cells, no interaction with Kidins220 was obtained (not shown), strongly suggesting that T cell polarization is needed for Kidins220-ICAM-3 interaction to occur.

Some trans-membrane adhesion molecules selectively compartmentalized at the uropod, including ICAM-1, -2 and -3, CD43, CD44 and PSGL-1, interact with the ERM proteins. This family of proteins play a key role in the polarized distribution of these molecules as well as in the uropod formation (151, 258, 332). We subsequently decided to elucidate whether Kidins220, as another novel uropod transmembrane molecule, could interact with ERM proteins. Western blot analysis of Kidins220 immunoprecipitates with anti-ERM antibodies clearly showed that this family of membrane-cytoskeleton linkers also interacted with Kidins220 (Fig. 5B, left panel). The presence of ERM proteins in ICAM-3 immunoprecipitates was also checked as positive control (Fig. 5B, right panel).

### **T cell depolarization disrupts Kidins220 localization at the uropod and impairs its association with ICAM-3**

We finally studied whether stimuli disrupting cell polarity could alter Kidins220 distribution in this cell system. The actin cytoskeleton is central to the control of cell morphology, polarization and motility (315, 316). Because the formation of the uropod in T cells is hampered by treatment with F-actin depolymerising drugs (190), we tested whether Kidins220 localization was affected by

cytochalasin D treatment. As can be seen in figure 6A, Kidins220 polarized distribution at the uropod was lost in Peer cells after cytochalasin D incubation. This treatment also provoked the redistribution of ICAM-3 in these cells (Fig. 6B). The association of the two molecules under these circumstances was next analyzed. Cell extracts from Peer cells untreated or treated with cytochalasin D were immunoprecipitated with anti-ICAM-3 antibody and Kidins220 presence was checked by Western blot. Disorganization of F-actin with this drug, also impaired the interaction of Kidins220 with ICAM-3 (Fig. 6B), further indicating that the association of Kidins220 with ICAM-3 depends on T cell polarization.

It is well established that T cell stimulation with PKC activators such as the potent phorbol esters, also causes substantial changes in cell morphology, having severe consequences on the ability of lymphocytes to polarize, migrate or form cell-cell contacts (16, 277, 293). We therefore wanted to examine the effects of PKC activation by phorbol esters on Kidins220 polarization and ICAM-3 interaction. Treatment with Phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) for 15 min also provoked a loss of polarization of Kidins220 and ICAM-3 in Peer and HSB2 cells as shown by immunofluorescence and confocal microscopy (Fig. 7A and 7B, middle panels). Importantly, pre-incubation with the PKC inhibitor GF109203X or bisindolylmaleimide I (GF-I) prevented the changes observed after PDBu treatment on the polarized distribution of both proteins (Fig. 7A and 7B, lower panels). Accordingly to the confocal microscopy studies, PDBu stimulation caused a significant decrease of Kidins220-ICAM-3 interaction as assessed by immunoprecipitation experiments from Peer cell lysates (Fig. 7C). Finally, GF-I pre-treatment was able to impair the effects of PDBu, keeping the association between Kidins220 and ICAM-3 intact. Kidins220 signal in the same samples determined by Western blot was used as a control of total protein content in the cell lysates (Fig. 7C, left panel, up). The efficiency of PDBu and GF-I treatments, activating or inhibiting PKC, respectively, was also assessed. For that purpose, we determined the phosphorylation state of serine 916 within PKD1, a PKC effector. PKD1 is activated downstream the PKC pathways, it undergoes autophosphorylation at serine 916, and the

phosphorylation state of this serine is frequently used as a parameter to follow PKC activation (35, 183). Western blot analysis using anti-PSer916-PKD antibody showed an increase on PKD1 phosphorylation after PDBu treatment that was blocked by pre-treatment with GF-I (Fig. 7C, lower panel, PSer916 PKD). From this set of experiments we can conclude that stimuli that hamper T cell polarization have a huge impact on Kidins220 distribution and its molecular interaction with ICAM-3.

### **3 Discussion**

Kidins220 is a novel integral membrane protein of unknown function that was first identified in cells of nervous origin where it presents a polarized distribution, accumulating at the tip of extending neurites and growth cones (35, 117, 142). Herein, we demonstrate by RT-PCR and Western blot analysis that T lymphocytes express Kidins220, although the levels are significantly lower than in neural cells (Fig. 1). Immunofluorescence and confocal microscopy analysis show that Kidins220 cellular distribution changes upon T cell polarization. In spherical T lymphoblast Kidins220 presents a heterogeneous staining along the plasma membrane, however when T cells are polarized it highly concentrates at the rear end of the cell (Fig. 2). We confirmed the localization of Kidins220 at the uropod by double-immunostaining constitutively polarized T cells with molecules normally associated to the trailing end of these cells. With this detailed analysis, we found that Kidins220 signal highly overlaps with ICAM-3, CD43 and CD44 labelling at the uropod (Fig.3), clearly demonstrating that Kidins220 is a component of this pole in T lymphocytes. Opposite to what we observe here, we have recently published that Kidins220 is enriched on membrane protrusions at the leading edge of polarized migrating dendritic cells. Notably, in this cell type Kidins220 also colocalizes with ICAM-3, CD-43, CD-44 and the specific type C lectin DC-SIGN (DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin, (87)) at the front pole (239). Together, our results suggest that all these proteins may be distributed to one or other cellular pole, and confer functional characteristics to them, depending on the specific roles and/or activation state of the different types of leukocytes during the immune response.

Additionally, these findings point out a possible link between Kidins220 and the function exerted by these adhesion molecules or by the uropod, evidencing a possible role of Kidins220 in intercellular interaction and/or communication processes (further discussed below).

Membrane rafts and caveolae have been implicated in an ever-increasing number of biologically important phenomena (reviewed in (112, 226)). It has been previously demonstrated that the integrity of lipid rafts is essential for the generation and maintenance of morphologic, biochemical and functional polarity of T lymphocytes (112, 191, 226). Two clearly distinct types of rafts have been described in polarized T cells, enriched in GM1 and GM3 at the uropod and the leading edge, respectively (90, 91, 191). Consistent with the presence of a specific type of lipid rafts at the uropod of motile T cells, Kidins220 is embedded in GM1-rich plasma membrane microdomains (Fig. 4A) and floats in lipid rafts fractions after detergent solubilization and sucrose gradient centrifugation (Fig. 4E). Disruption of lipid rafts by MCDX treatment in Peer cells provokes the typical loss of T cell polarization, the concomitant redistribution of Kidins220 to other plasma membrane domains and its shift to more soluble fractions in the flotation sucrose gradients (Fig. 4B and 4E), indicating that rafts integrity is crucial for Kidins220 localization at the uropod. In agreement with these data, we have previously proven the importance of lipid rafts in Kidins220 cellular distribution in neural and dendritic cells (35, 239).

At present, some degree of controversy exists regarding the presence of caveolae and the expression of caveolins in T lymphocytes. For years it has been accepted that this special type of raft microdomains is not found in T lymphocytes because they do not express caveolins (272). According to this notion, it has been published that T lymphocytes can form these structures only when caveolin-1 is ectopically expressed (76). However, recent results obtained by using several specific antibodies, indicate that different T cell lines contain caveolin-1 (101, 300). Herein, we demonstrate for the first time by RT-PCR and DNA sequencing, that primary human T lymphoblasts, Jurkat cells and the constitutively polarized Peer cells, express caveolin-1 transcripts (Fig. 4C). Caveolin-1 is also detectable at the



protein level (Fig. 4D) and it is found in lipid raft fractions of Peer cells after sucrose gradient centrifugation (Fig. 4E). Caveolin-1 may have a function independently of the existence of caveolae in T cells. To analyse the role of this protein in T cells and to define what are the physiological consequences of Kidins220 and caveolin-1 interactions are interesting issues to address in the future. Kidins220 interacts with ICAM-3 and with the ERM family of proteins in polarized T cells (Fig. 5). The relationship between adhesion molecules and the cytoskeleton is vital for leukocyte migration, cell-cell interactions and the organization of specialized protrusions. The ERM family of proteins can function as molecular linkers between the plasma membrane and the cytoskeleton and play a key role during polarization, in the cellular relocation of adhesion membrane proteins and the formation of the uropod (151, 258, 259, 304). They can associate to F-actin through their actin-binding domain and to other membrane proteins like PSGL-1, CD43 and CD44 and ICAM-2 and -3 via their N-terminal FERM domain (5, 258, 302, 332). ICAM-3 associates with the cytoskeleton through its interaction with ERM proteins (258). Hamada et al, have extensively studied the cytosolic region of ICAMs and found at the justa-membrane region a FERM binding motif responsible for their binding to ERM proteins (96). We could not find a clear FERM binding motif within Kidins220 sequence, which suggest that other domains might be involved in the interaction with ERM proteins. One attractive possibility would be that Kidins220 associates with ERM proteins indirectly. The C-terminal end of Kidins220 constitutes a PDZ binding motif for PDZ domains of type I (164, 252). The FERM domain of ERMs proteins is known to bind the PDZ proteins NHERF/EBP50 (27, 202, 232, 304), which could serve as adaptors to establish a bridge between this family of proteins and Kidins220. The ERM family of proteins might in this way mediate the association of Kidins220 with ICAM-3 in polarized T lymphocytes. Evidence suggesting that ICAM-3 and Kidins220 interaction may not be direct was obtained by using a GST-fusion protein containing the cytoplasmic tail of ICAM-3, which was unable to pull down Kidins220 from Peer extracts (not shown). This result does not exclude that this two molecules interact through their transmembrane domains. We were unable to test this possibility since

a GST-fusion protein containing ICAM-3 transmembrane domain was completely insoluble. Additionally, Kidins220 when ectopically expressed is not properly targeted to the plasma membrane and its localization highly differs from that of the endogenous protein in all the cell types we have analyzed (our own unpublished observation, supplementary figures in (252) and (164). Therefore, the results that could be derived from using this approach may not be accurate.

The association of ICAM-3 and Kidins220 depends on cellular polarization, since depolarizing stimuli such as treatment with the F-actin disorganizing drug cytochalasin D (Fig. 6) or phorbol esters (Fig.7) disrupts Kidins220-ICAM-3 complexes and their localization at the uropod. Previous works have shown that phorbol ester treatment provokes a relocation of ICAM-3, changing its pattern of staining at the uropod to a more uniform distribution at the plasma membrane (37), and results in the induction of serine phosphorylation of the cytoplasmic tail of ICAM-3 (107). More recently, Serrador and coworkers have demonstrated that the phosphorylation of various serine residues in this cytosolic domain of ICAM-3 plays a critical role in the binding of ERMs and the targeting of this adhesion receptor to the cellular uropod (261). Additionally, the phosphorylation of ERM proteins regulates their selective localization in the uropod and controls the establishment of cell polarization, uropod formation and cell migration (151). Several serine-threonine kinases, including PKCs, have been shown to phosphorylate ERM proteins (169) (28, 303). In this context, it has been proposed that PKC- $\theta$  could be implicated in the phosphorylation of the cytoplasmic tail of ICAM-3 (107) and the C-terminal region of moesin (225). All these observations together with our own results presented here, fit in a model in which Kidins220, ICAM-3 and ERM proteins form a complex at the uropod that could be disrupted (dissociated) by a phosphorylation step dependent on the activation of PKC pathways. In agreement with this view, the PKC inhibitor GF-1 preserves both the localization of Kidins220 and ICAM-3 at the uropod, and their interaction (Fig.7). It is feasible that Kidins220 may also undergo PKC-dependent phosphorylation in polarized T cells upon phorbol ester stimulation, leading to its uncoupling from the complex and redistribution from the uropod to other plasma membrane regions,

the same way as it occurs with ICAM-3. Related to this, we have demonstrated that phorbol ester treatment induces at least the phosphorylation of one residue, serine 919, within Kidins220 sequence (117). To determine whether the phosphorylation of this or other residues in Kidins220 participate in all these processes and to investigate how PKC pathways are regulating the dissociation of this tripartite complex is an issue that deserves further investigation. The physiological relationships between Kidins220, adhesion molecules, ERM proteins and PKCs, will have to be clarified to better understand the mechanisms controlling lymphocyte polarity and motility.

ICAM-3 belongs to a family of membrane proteins constituted by five members (ICAM-1 to -5) classified into the superfamily of immunoglobulin-adhesion molecules, being the major form present in lymphocytes. ICAM-3 has been extensively characterized as a signalling molecule, regulating migration, adhesion and activity of T lymphocytes and also of dendritic cells within the immune system (21, 22, 36, 37, 47, 49, 87, 109, 197, 198, 307). ICAM-3 also acts as costimulatory molecule to increase human immunodeficiency virus type 1 replication (18). First discovered as a ligand for  $\beta 2$  integrins (46), ICAM-3 has been shown to specifically mediate intercellular interactions during homotypic cellular aggregation, and to regulate the binding of T cells to extracellular matrix or to the surface of endothelial cells, by actively increasing the binding of  $\beta 1$  and  $\beta 2$  integrins to their different substrates (36, 37, 109). In naïve T lymphocytes, which express ICAM-3 constitutively, this molecule is a key player in the early stages of the initiation and activation of inflammatory responses, modulating the first contact between T lymphocytes and dendritic cells by binding DC-SIGN (22, 87), and facilitating stronger cellular interactions, conjugate formation and activation of the T cell receptor or T cell-priming, and triggering of their migration from the lymphatic nodes through the blood stream to the site of infection where they will carry out their immunological function (197, 198). The colocalization and interaction of Kidins220 with ICAM-3 opens the perspective of a possible regulation of ICAM-3 function by Kidins220 and/or the participation of Kidins220 in the important

processes where this adhesion molecule has been involved. Experiments addressed to establish such a connexion will be of vital importance.

Although the uropod function is still poorly understood, this protruding structure has been shown to participate in multiple and diverse processes. Several pieces of evidence indicate that the uropod is an important adhesive structure that clusters adhesion molecules during T cell migration and mediates homotypical interactions among T cells through ICAM-3 (49, 251). These type of interactions are crucial for the capture and recruitment of other passing by T cells and their migration to the areas of inflammation (49, 231). In general, cell adhesion molecules concentrated at the uropod, including ICAM-3, present a very short cytoplasmic domain. However, the plethora of different structural cytosolic domains present in Kidins220 that could mediate a multitude of protein-protein interactions and link this protein to the cytoskeleton suggests that it might play a central role in the scaffolding of adaptor and signalling molecules, membrane proteins and the cytoskeletal network, making in this way an important contribution to the uropod formation and maintenance, and lymphocyte polarization, migration, adhesion and motility.

## **4 Materials and Methods**

### **4.1 Reagents and Materials**

Phorbol 12,13dibutyrate (PDBu), methyl- $\alpha$ -cyclodextrin (MCDX) were from Sigma-Aldrich (UK). GF I (GF109203X or bisindolylmaleimide I) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Cytochalasin D was from Sigma-Aldrich (UK). The polyclonal antibody anti-Kidins220 and the monoclonal antibodies anti-ICAM-3 TP1/24, anti-ICAM-3, anti-CD43, anti-CD44, and anti-CD45 have been previously described (117) (35, 36). The rabbit polyclonal antibody against Caveolin-1 was from Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, USA). The rabbit polyclonal antibody against ERM proteins was from Cell Signalling Technology Inc (Beverly, MA, USA). A phosphospecific antibody recognizing Ser<sup>916</sup> (183) was kindly provided by Dr. S. Matthews and D. Cantrell (University of

Dundee, UK). Texas Red- and Alexa 488-conjugated secondary antibodies, as well as Texas Red-cholera toxin B were purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody and ECL were from GE Healthcare Limited (UK). Oligonucleotide primers and reverse transcriptase were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and Taq polymerase was from Biotools SA (Madrid, Spain). All other reagents were from standard suppliers or as indicated in the text.

#### **4.2 Cells culture and treatments**

Human T lymphoblasts were prepared following standard procedures as previously described (242, 243). Peer  $\gamma\delta$  CD3<sup>+</sup> human T cell line, HSB2 lymphoblastoid cell line, and Jurkat JHM/2.2 clone were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 10% FCS. PC12 rat pheochromocytoma cells were cultured as previously described (117). When required, cells were treated with MCDX, (15 mM) for 1 h, Cytochalasin D (5  $\mu$ g/ml) for 30 min, GF-I (3.5  $\mu$ M) for 1 h or PDBu (200 nM) for 15 min, as specified in the text or figure legends.

#### **4.3 RT-PCR analysis**

Total RNA was isolated from different cells using TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), treated with DNase and reversed transcribed into cDNA. The specific sequences of human Kidins220 were PCR amplified for 35 cycles using specific pairs of primers as previously reported (239). After amplification, the primers yielded specific PCR fragments of 853 base pairs. To detect the expression of caveolin-1 (Human caveolin-1, accession number NM\_001753), specific pairs of primers were designed (Upper primer, position 1: 5'-ATG TCT GGG GGC AAA TAC GTA G- 3'; Lower primer, position 118: 5'-GTG TGC GCG TCG TAC ACT TG- 3') and used as specified above. A PCR fragment of 137 base pairs was obtained. The identity of the PCR products was verified by sequencing using an Applied Biosystems automated DNA sequencer.

#### **4.4 Immunofluorescence and confocal microscopy**

For immunofluorescence cells were seeded onto coverslips coated with fibronectin (25 µg/ml) and were allowed to settle in a cell incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 30 min. Then cells were subjected to the different treatments and finally they were fixed and permeabilized with methanol for 4 min at -20°C. After blocking (1% BSA for 15 min), cells were incubated with the corresponding primary antibodies for 1 h at room temperature, detected with the suitable fluorophore-conjugated secondary antibody before mounting in slides with Mowiol 4-88 (Harco, UK). Some cells were preincubated with Texas Red-conjugated Cholera-Toxin B (CTB, 50 µg/ml), for 30 min at 4°C, to allow its binding on the cell surface to the ganglioside type 1, GM1, before fixation and visualization. All confocal images were acquired using an inverted Zeiss LSM510 Meta laser confocal microscope (Germany) with a 63x Plan-Apochromatic oil immersion objective and were normalized for each colour separately. Confocal images presented are single sections of a series or two-dimensional maximal projections of a z-series through the cell depth, as specified in the text and figure legends. Images were processed for presentation with Zeiss LSM5 Image Browser and Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc, CA).

#### **4.5 Isolation of Lipid Rafts**

Lipid rafts were isolated in running sucrose gradients as described (35, 239). Briefly, Peer cells were resuspended in serum free medium and pre-treated or not for 1h at 37°C with 15mM MCDX. Trypan blue staining showed that MCDX treatment did not affect cell viability. Cells were resuspended in 1 ml of 0.25% Triton X-100 solubilization buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.25% TritonX-100) plus inhibitors and solubilized for 30 min at 4 °C. Sucrose concentration of the lysates was adjusted to 41% before they were overlaid with 8.5 ml of 35% sucrose and 2.5 ml of 16% sucrose prepared in 10 mM Tris, pH 7.4. For lipid rafts isolation, tubes were ultracentrifuged (35000 rpm in a SW41 rotor, 18 h, 4 °C), and 10 fractions were collected from each gradient (from the top to the bottom, fractions 1–10), precipitated with 6.5% trichloroacetic acid in the presence of 0.05%

sodium deoxycholate, washed with 80% cold acetone, dissolved and boiled in 2x Laemmli sample buffer. Samples were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting.

#### **4.6 Immunoprecipitation and Western Blot Analysis**

Cells were collected by centrifugation and lysed for 30 min at 4°C in RIPA-buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT) with protease and phosphatase inhibitors. Kidins220 immunoprecipitation was carried out as described previously (117). ICAM-3 and ERM proteins immunoprecipitation was performed with purified anti-ICAM-3 TP1/24 directly coupled to protein G-Sepharose beads or anti-ERM proteins coupled to Protein A-Sepharose beads. Immune-complexes were washed 6 times with RIPA-buffer. For Western blot analysis, total cell lysates, immunoprecipitates, or different fractions of cells were boiled for 5 min in 2x Laemmli sample buffer, and analyzed by SDS-PAGE followed by transfer (200 mM glycine, 25 mM Tris, 10% CH<sub>3</sub>OH) to nitrocellulose (Schleicher and Schuell BioScience, Germany) at 350 mA for 70 min at 4°C. Membranes were blocked in TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20) plus 5% low-fat milk powder, and incubated for 1 h at room temperature with the different primary antibodies in blocking solution (TBST, 5% low-fat milk). Membranes were incubated with the appropriate secondary antibodies conjugated to peroxidase in blocking solution, and immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence. For peptide competition, anti-Kidins220 polyclonal antiserum was incubated with immunizing peptide as described (117) (239)

**Acknowledgements:** This work was supported by grants PI020704 and PI021058 to TI and JLRF, respectively. RMJ is a fellow I3P supported by BIOTOOLS SA and the CSIC. LRB was supported by a scholarship associated to grant PI021058. CLM is recipient of a fellowship (FPU) conferred by the “Ministerio de Educación y Ciencia” (MEC).



## References

- 1 **Iglesias, T., Cabrera-Poch, N., Mitchell, M. P., Naven, T. J., Rozengurt, E. and Schiavo, G.,** Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* 2000. **275**: 40048-40056.
- 2 **Kong, H., Boulter, J., Weber, J. L., Lai, C. and Chao, M. V.,** An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci* 2001. **21**: 176-185.
- 3 **Sedgwick, S. G. and Smerdon, S. J.,** The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biol Sci* 1999. **24**: 311-316.
- 4 **Schultz, J., Ponting, C. P., Hofmann, K. and Bork, P.,** SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci.* 1997. **6**: 249-253.
- 5 **Luo, S., Chen, Y., Lai, K. O., Arevalo, J. C., Froehner, S. C., Adams, M. E., Chao, M. V. and Ip, N. Y.,** {alpha}-Syntrophin regulates ARMS localization at the neuromuscular junction and enhances EphA4 signaling in an ARMS-dependent manner. *J Cell Biol* 2005. **169**: 813-824.
- 6 **Sanchez-Ruiloba, L., Cabrera-Poch, N., Rodriguez-Martinez, M., Lopez-Menendez, C., Jean-Mairet, R. M., Higuero, A. M. and Iglesias, T.,** Protein kinase D intracellular localization and activity control kinase D-interacting substrate of 220-kDa traffic through a postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens-1-binding motif. *J Biol Chem* 2006. **281**: 18888-18900.
- 7 **Rodriguez-Boulant, E. and Powell, S. K.,** Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol* 1992. **8**: 395-427.
- 8 **Arimura, N. and Kaibuchi, K.,** Key regulators in neuronal polarity. *Neuron* 2005. **48**: 881-884.
- 9 **Mitchison, T. J. and Cramer, L. P.,** Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 1996. **84**: 371-379.
- 10 **Cabrera-Poch, N., Sanchez-Ruiloba, L., Rodriguez-Martinez, M. and Iglesias, T.,** Lipid raft disruption triggers protein kinase C and Src-dependent protein kinase D activation and Kidins220 phosphorylation in neuronal cells. *J Biol Chem* 2004. **279**: 28592-28602.
- 11 **Serrador, J. M., Nieto, M. and Sanchez-Madrid, F.,** Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol* 1999. **9**: 228-233.
- 12 **Vicente-Manzanares, M., Rey, M., Jones, D. R., Sancho, D., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., del Pozo, M. A., Yanez-Mo, M., de Ana, A. M., Martinez, A. C., Merida, I. and Sanchez-Madrid, F.,** Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *J Immunol* 1999. **163**: 4001-4012.
- 13 **Miletic, A. V., Swat, M., Fujikawa, K. and Swat, W.,** Cytoskeletal remodeling in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 2003. **15**: 261-268.
- 14 **Vicente-Manzanares, M. and Sanchez-Madrid, F.,** Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 2004. **4**: 110-122.
- 15 **Sanchez-Madrid, F. and del Pozo, M. A.,** Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* 1999. **18**: 501-511.
- 16 **Campanero, M. R., del Pozo, M. A., Arroyo, A. G., Sanchez-Mateos, P., Hernandez-Caselles, T., Craig, A., Pulido, R. and Sanchez-Madrid, F.,** ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J Cell Biol* 1993. **123**: 1007-1016.
- 17 **Campanero, M. R., Sanchez-Mateos, P., del Pozo, M. A. and Sanchez-Madrid, F.,** ICAM-3 regulates lymphocyte morphology and integrin-mediated T cell interaction with endothelial cell and extracellular matrix ligands. *J Cell Biol* 1994. **127**: 867-878.

- 18 **Negulescu, P. A., Krasieva, T. B., Khan, A., Kerschbaum, H. H. and Cahalan, M. D.,** Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* 1996. **4**: 421-430.
- 19 **Nieto, M., del Pozo, M. A. and Sanchez-Madrid, F.,** Interleukin-15 induces adhesion receptor redistribution in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996. **26**: 1302-1307.
- 20 **Nieto, M., Frade, J. M., Sancho, D., Mellado, M., Martinez, A. C. and Sanchez-Madrid, F.,** Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J Exp Med* 1997. **186**: 153-158.
- 21 **del Pozo, M. A., Nieto, M., Serrador, J. M., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., Martinez, C. and Sanchez-Madrid, F.,** The two poles of the lymphocyte: specialized cell compartments for migration and recruitment. *Cell Adhes Commun* 1998. **6**: 125-133.
- 22 **Montoya, M. C., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M. and Sanchez-Madrid, F.,** Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 2002. **186**: 68-82.
- 23 **del Pozo, M. A., Sanchez-Mateos, P., Nieto, M. and Sanchez-Madrid, F.,** Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 1995. **131**: 495-508.
- 24 **Bruehl, R. E., Moore, K. L., Lorant, D. E., Borregaard, N., Zimmerman, G. A., McEver, R. P. and Bainton, D. F.,** Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Leukoc Biol* 1997. **61**: 489-499.
- 25 **Gomez-Mouton, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., Gallardo, E., Jimenez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Manes, S. and Martinez, A. C.,** Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. **98**: 9642-9647.
- 26 **Millan, J., Montoya, M. C., Sancho, D., Sanchez-Madrid, F. and Alonso, M. A.,** Lipid rafts mediate biosynthetic transport to the T lymphocyte uropod subdomain and are necessary for uropod integrity and function. *Blood* 2002. **99**: 978-984.
- 27 **Gomez-Mouton, C., Lacalle, R. A., Mira, E., Jimenez-Baranda, S., Barber, D. F., Carrera, A. C., Martinez, A. C. and Manes, S.,** Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol* 2004. **164**: 759-768.
- 28 **Ratner, S., Sherrod, W. S. and Lichlyter, D.,** Microtubule retraction into the uropod and its role in T cell polarization and motility. *J Immunol* 1997. **159**: 1063-1067.
- 29 **Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A. and Tsukita, S.,** ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 1994. **126**: 391-401.
- 30 **Tsukita, S. and Yonemura, S.,** ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1997. **9**: 70-75.
- 31 **Serrador, J. M., Alonso-Lebrero, J. L., del Pozo, M. A., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Calvo, J., Lozano, F. and Sanchez-Madrid, F.,** Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol* 1997. **138**: 1409-1423.
- 32 **Riol-Blanco, L., Iglesias, T., Sanchez-Sanchez, N., de la Rosa, G., Sanchez-Ruiloba, L., Cabrera-Poch, N., Torres, A., Longo, I., Garcia-Bordas, J., Longo, N., Tejedor, A., Sanchez-Mateos, P. and Rodriguez-Fernandez, J. L.,** The neuronal protein Kidins220 localizes in a raft compartment at the leading edge of motile immature dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004. **34**: 108-118.
- 33 **Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T. and Lisanti, M. P.,** Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999. **19**: 7289-7304.
- 34 **Horejsi, V.,** The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol Rev* 2003. **191**: 148-164.

- 35 **Pizzo, P. and Viola, A.,** Lymphocyte lipid rafts: structure and function. *Curr Opin Immunol* 2003. **15**: 255-260.
- 36 **Hatanaka, M., Maeda, T., Ikemoto, T., Mori, H., Seya, T. and Shimizu, A.,** Expression of caveolin-1 in human T cell leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998. **253**: 382-387.
- 37 **Tsuji, Y., Hatanaka, M., Maeda, T., Seya, T., Takenaka, H. and Shimizu, A.,** Differential-expression and tyrosine-phosphorylation profiles of caveolin isoforms in human T cell leukemia cell lines. *Int J Mol Med* 2005. **16**: 889-893.
- 38 **Alegre-Cebollada, J., Rodriguez-Crespo, I., Gavilanes, J. G. and del Pozo, A. M.,** Detergent-resistant membranes are platforms for actinoporin pore-forming activity on intact cells. *Febs J* 2006. **273**: 863-871.
- 39 **Oh, P. and Schnitzer, J. E.,** Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell* 2001. **12**: 685-698.
- 40 **Simons, K. and Toomre, D.,** Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 2000. **1**: 31-39.
- 41 **Brown, D. A. and London, E.,** Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 2000. **275**: 17221-17224.
- 42 **Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S. and Tsukita, S.,** Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 1998. **140**: 885-895.
- 43 **Lee, J. H., Katakai, T., Hara, T., Gonda, H., Sugai, M. and Shimizu, A.,** Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *J Cell Biol* 2004. **167**: 327-337.
- 44 **Vicente-Manzanares, M., Sancho, D., Yanez-Mo, M. and Sanchez-Madrid, F.,** The leukocyte cytoskeleton in cell migration and immune interactions. *Int Rev Cytol* 2002. **216**: 233-289.
- 45 **Baier, G.,** The PKC gene module: molecular biosystematics to resolve its T cell functions. *Immunol Rev* 2003. **192**: 64-79.
- 46 **Tan, S. L. and Parker, P. J.,** Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem J* 2003. **376**: 545-552.
- 47 **Spitaler, M. and Cantrell, D. A.,** Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* 2004. **5**: 785-790.
- 48 **Matthews, S. A., Rozengurt, E. and Cantrell, D.,** Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase Cmu. *J Biol Chem* 1999. **274**: 26543-26549.
- 49 **Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y. and Figdor, C. G.,** Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000. **100**: 575-585.
- 50 **Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K. and Parton, R. G.,** De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. **92**: 8655-8659.
- 51 **Serrador, J. M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J. L., del Pozo, M. A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Mateos, P. and Sanchez-Madrid, F.,** CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 1998. **91**: 4632-4644.
- 52 **Alonso-Lebrero, J. L., Serrador, J. M., Dominguez-Jimenez, C., Barreiro, O., Luque, A., del Pozo, M. A., Snapp, K., Kansas, G., Schwartz-Albiez, R., Furthmayr, H., Lozano, F. and Sanchez-Madrid, F.,** Polarization and interaction of adhesion molecules P-selectin

glycoprotein ligand 1 and intercellular adhesion molecule 3 with moesin and ezrin in myeloid cells. *Blood* 2000. **95**: 2413-2419.

- 53 **Hamada, K., Shimizu, T., Yonemura, S., Tsukita, S., Tsukita, S. and Hakoshima, T.,** Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *Embo J* 2003. **22**: 502-514.
- 54 **Reczek, D., Berryman, M. and Bretscher, A.,** Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* 1997. **139**: 169-179.
- 55 **Murthy, A., Gonzalez-Agosti, C., Cordero, E., Pinney, D., Candia, C., Solomon, F., Gusella, J. and Ramesh, V.,** NHE-RF, a regulatory cofactor for Na(+)-H<sup>+</sup> exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins. *J Biol Chem* 1998. **273**: 1273-1276.
- 56 **Bretscher, A., Chambers, D., Nguyen, R. and Reczek, D.,** ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000. **16**: 113-143.
- 57 **Hayflick, J. S., Stine, J., Fox, R., Hoekstra, D. and Gallatin, W. M.,** Functional mapping of the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 reveals important roles for serine residues. *J Biol Chem* 1997. **272**: 22207-22214.
- 58 **Serrador, J. M., Vicente-Manzanares, M., Calvo, J., Barreiro, O., Montoya, M. C., Schwartz-Albiez, R., Furthmayr, H., Lozano, F. and Sanchez-Madrid, F.,** A novel serine-rich motif in the intercellular adhesion molecule 3 is critical for its ezrin/radixin/moesin-directed subcellular targeting. *J Biol Chem* 2002. **277**: 10400-10409.
- 59 **Mangeat, P., Roy, C. and Martin, M.,** ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 1999. **9**: 187-192.
- 60 **Tsukita, S. and Yonemura, S.,** Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 1999. **274**: 34507-34510.
- 61 **Bretscher, A., Edwards, K. and Fehon, R. G.,** ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002. **3**: 586-599.
- 62 **Pietromonaco, S. F., Simons, P. C., Altman, A. and Elias, L.,** Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem* 1998. **273**: 7594-7603.
- 63 **Hernandez-Caselles, T., Rubio, G., Campanero, M. R., del Pozo, M. A., Muro, M., Sanchez-Madrid, F. and Aparicio, P.,** ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993. **23**: 2799-2806.
- 64 **del Pozo, M. A., Cabanas, C., Montoya, M. C., Ager, A., Sanchez-Mateos, P. and Sanchez-Madrid, F.,** ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J Cell Biol* 1997. **137**: 493-508.
- 65 **Bleijds, D. A., de Waal-Malefyt, R., Figdor, C. G. and van Kooyk, Y.,** Co-stimulation of T cells results in distinct IL-10 and TNF-alpha cytokine profiles dependent on binding to ICAM-1, ICAM-2 or ICAM-3. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 2248-2258.
- 66 **Bleijds, D. A., Geijtenbeek, T. B., Figdor, C. G. and van Kooyk, Y.,** DC-SIGN and LFA-1: a battle for ligand. *Trends Immunol* 2001. **22**: 457-463.
- 67 **van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T. B.,** A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol Rev* 2002. **186**: 47-56.
- 68 **Montoya, M. C., Sancho, D., Bonello, G., Collette, Y., Langlet, C., He, H. T., Aparicio, P., Alcover, A., Olive, D. and Sanchez-Madrid, F.,** Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol* 2002. **3**: 159-168.
- 69 **de la Fuente, H., Mittelbrunn, M., Sanchez-Martin, L., Vicente-Manzanares, M., Lamana, A., Pardi, R., Cabanas, C. and Sanchez-Madrid, F.,** Synaptic clusters of MHC class II molecules induced on DCs by adhesion molecule-mediated initial T-cell scanning. *Mol Biol Cell* 2005. **16**: 3314-3322.

- 70 **Barat, C., Gervais, P. and Tremblay, M. J.,** Engagement of ICAM-3 provides a costimulatory signal for human immunodeficiency virus type 1 replication in both activated and quiescent CD4<sup>+</sup> T lymphocytes: implications for virus pathogenesis. *J Virol* 2004. **78**: 6692-6697.
- 71 **de Fougerolles, A. R. and Springer, T. A.,** Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* 1992. **175**: 185-190.
- 72 **Rodriguez-Fernandez, J. L., Gomez, M., Luque, A., Hogg, N., Sanchez-Madrid, F. and Cabanas, C.,** The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 1999. **10**: 1891-1907.
- 73 **Rodriguez-Fernandez, J. L., Sanchez-Martin, L., Rey, M., Vicente-Manzanares, M., Narumiya, S., Teixido, J., Sanchez-Madrid, F. and Cabanas, C.,** Rho and Rho-associated kinase modulate the tyrosine kinase PYK2 in T-cells through regulation of the activity of the integrin LFA-1. *J Biol Chem* 2001. **276**: 40518-40527.

## Figure Legends

**Fig. 1. Kidins220 is expressed in T lymphocytes.** (A) cDNAs prepared from total RNA from rat PC12, human T lymphoblasts (T Blast), Peer and HSB2 cells were analyzed for the presence of Kidins220 transcripts by RT-PCR. An 853 bp fragment was amplified using specific pairs of primers. (B) Kidins220 protein was detected in 100 µg of total protein obtained from lysates of PC12, T lymphoblasts (T Blast), Peer and HSB2 cells by Western blotting with an anti-Kidins220 polyclonal antibody (-). Note that the levels of Kidins220 protein are significantly higher in PC12 cells than in T cells, and different exposures had to be done to obtain a visible band in PC12 (short exposure), Peer and HSB2 cells (medium exposure) or proliferating T lymphoblasts (long exposure). The same antiserum blocked by pre-incubation with the immunizing peptide was used to show the specificity of the band (+, blocking peptide).

**Fig. 2. Kidins220 localization in non-polarized and polarized T cells.** (A) Non-polarized or polarized proliferating T lymphoblasts grown in the presence of phytohemagglutinin and interleukin-2 and seeded onto fibronectin-coated coverslips were stained with anti-Kidins220 polyclonal antiserum. Confocal microscope pictures correspond to a single section of a series. The protruding uropod of the polarized T cell is labelled (arrowhead). (B) Peer and HSB2 constitutively polarized T cell lines were seeded onto fibronectin-coated coverslips and stained with anti-Kidins220 polyclonal antibody. Confocal images show single sections from the bottom (0.6 µm from the substrate) or the top (3 µm from the substrate) of the cells, and the projection of a complete series of sections. Nomarski pictures show the shape of the cells. Scale bar: 2 µm

**Fig. 3. Kidins220 co-localizes with the uropod markers ICAM-3, CD43 and CD44 in polarized T cells.** Peer and HSB2 cell lines seeded onto fibronectin-coated coverslips were fixed and double stained with anti-Kidins220 polyclonal antibody and anti-ICAM-3, anti-CD43 or anti-CD44 (A) or anti-CD45 (B) monoclonal antibodies. Confocal microscope images correspond to a single section of

the cells. Notice that Kidins220 staining highly overlaps at the uropod with ICAM-3, CD43 and CD44 (see yellow colour in the merge images). Scale bar: 8  $\mu$ m.

**Fig. 4. Kidins220 is embedded in lipid rafts and interacts with caveolin-1** (A) Staining of the lipid raft-associated ganglioside GM1 visualized by Texas Red–conjugated cholera toxin B binding to living Peer, later fixed and labelled with anti-Kidins220 antibodies. Confocal microscope images correspond to a projection. Scale bar: 4  $\mu$ m (B) Peer cells were treated with 7.5mM methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCDX) for 1h at 37°C and stained with anti-Kidins220 antibodies. Bright field pictures show the shape of the cells. Confocal microscope images correspond to a projection. Scale bar: 8  $\mu$ m. (C) cDNAs prepared from total RNA from human T lymphoblasts (T Blast), Jurkat (JHM) and Peer cells were analyzed for the presence of caveolin-1 transcripts by RT-PCR. A specific fragment of 137 bp, corresponding to caveolin-1, was amplified using specific pairs of primers. (D) Caveolin-1 protein levels were analyzed in total cell lysates from human T lymphoblasts (T Blast), Jurkat (JHM) and Peer cells by Western blot (WB) using a specific antibody. A band of approximately 22 kDa was detected. Cos-7 and the neuroblastoma cell line N2a were used as positive and negative control for caveolin-1 specific signal, respectively. (E) Identification of Kidins220 in the lipid rafts fractions of sucrose gradients. Peer cells untreated or treated with MCDX as above, were solubilized in 0.25% TritonX-100 and ten fractions were collected after ultracentrifugation in sucrose gradients (from top to bottom fractions 1-10, see “Materials and methods” for details). The presence of Kidins220 and caveolin-1 in the different fractions was analyzed by Western blot (WB). MCDX treatment efficiently eliminates Kidins220 and caveolin-1 from the raft compartment (fraction 3) to the soluble fractions at the bottom of the gradient (fractions 9 and 10). (F) Lysates from Peer cells were immunoprecipitated with anti-Kidins220 (IP Kidins220) or anti-caveolin-1 (IP caveolin) antibodies and the presence of both proteins in the immunoprecipitates was confirmed by Western blot (WB) analysis. The immunoglobulin band is marked with an arrowhead. Results are representative of three independent experiments.

**Fig. 5. Kidins220 interacts with ICAM-3 and with the family of ERM proteins.** (A) Lysates from Peer and HSB2 cells were immunoprecipitated with anti-ICAM-3 (IP ICAM-3) antibodies and the presence of Kidins220 in the immunoprecipitates was assessed by Western blot (WB). (B) Total Peer cell extracts (TL), anti-Kidins220 or anti-ICAM-3 immunoprecipitates (IP), were Western blot (WB) analysed for the presence of the ERM proteins using an antibody recognizing all members of the family. Results are representative of three independent experiments.

**Fig. 6. Disorganization of the actin cytoskeleton alters Kidins220 polarized localization and association to ICAM-3.** (A) Peer cells untreated (-) or treated (+) with cytochalasin D (Cyt.D, 5  $\mu$ g/ml for 30 min) were double stained with anti-Kidins220 (red) and anti-ICAM-3 (green) antibodies. Note that the polarized distribution of both proteins is lost after cytochalasin D treatment. Confocal microscopy images correspond to the projection of a series of sections. Bright field pictures show the shape of the cells. Scale bar, 4  $\mu$ m. (B) ICAM-3 was immunoprecipitated from Peer cells treated (+) or not (-) with cytochalasin D (Cyt.D) and the presence of Kidins220 was assessed by Western blot analysis (WB) using specific antibodies. Notice that cytochalasin D treatment abolishes the association between Kidins220 and ICAM-3. Kidins220 immunoprecipitates (IP Kidins220) were run in parallel as a positive control for Kidins220 signal in the immunoprecipitates. Results are representative of three independent experiments.

**Fig. 7. Phorbol ester treatment provokes the redistribution of Kidins220 out of the uropod and its dissociation from ICAM-3 by a mechanism dependent on protein kinase C.** (A) Peer cells and (B) HSB2 cells seeded onto fibronectin-coated coverslips were untreated (-) or pretreated (+) with 3.5  $\mu$ M of the protein kinase C inhibitor GF-I for 1 h, and then stimulated (+) or not (-) with 200 nM PDBu for 15 min. Double staining with anti-Kidins220 (red) and anti-ICAM-3 (green) antibodies were performed. Note that PDBu treatment dislocalizes Kidins220 and ICAM-3 from the uropod and that GF-I pretreatment preserve their polarization. Confocal microscopy images correspond to the maximal projection. Bright field pictures show the shape of the cells. Scale bar 4 $\mu$ m. (C) ICAM-3



immunoprecipitates from Peer cells pretreated (+) or not (-) with GF-I and later stimulated (-) or not (+) with PDBu as above, were analyzed for the presence of Kidins220 by Western blot (WB) using anti-Kidins220 antibodies. The signal of Kidins220 in the total lysates is also shown (left panel). Western blotting with an antibody recognizing auto-phosphorylated Serine-916 within active PKD1 (PSer916PKD) was used as a positive control for the activation or inhibition of the protein kinase C signaling pathway by phorbol esters and GF-I, respectively. The association of Kidins220 with ICAM-3 decreases significantly after PDBu stimulation, and GF-I pretreatment prevents the dissociation of these two molecules. Results are representative of three independent experiments.

Fig 1.

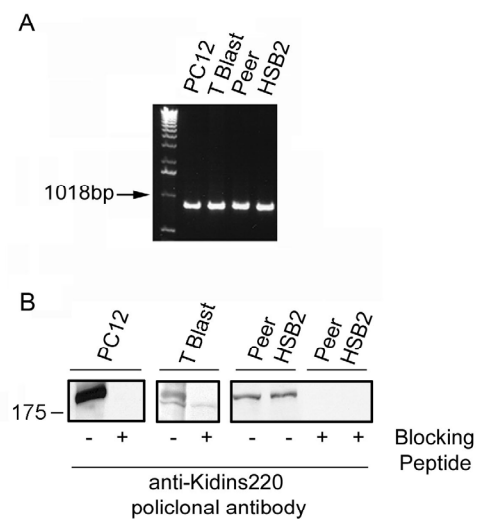


Fig 2.

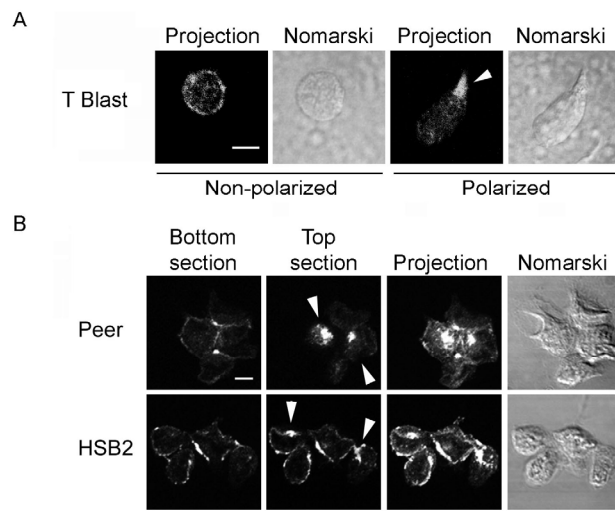


Fig 3.

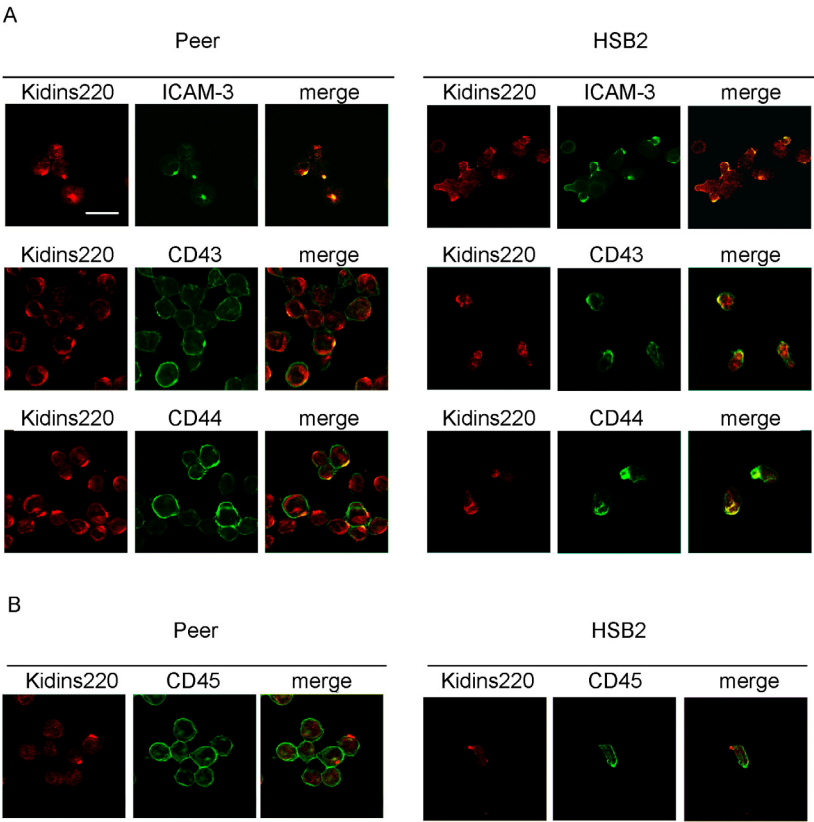


Fig 4.

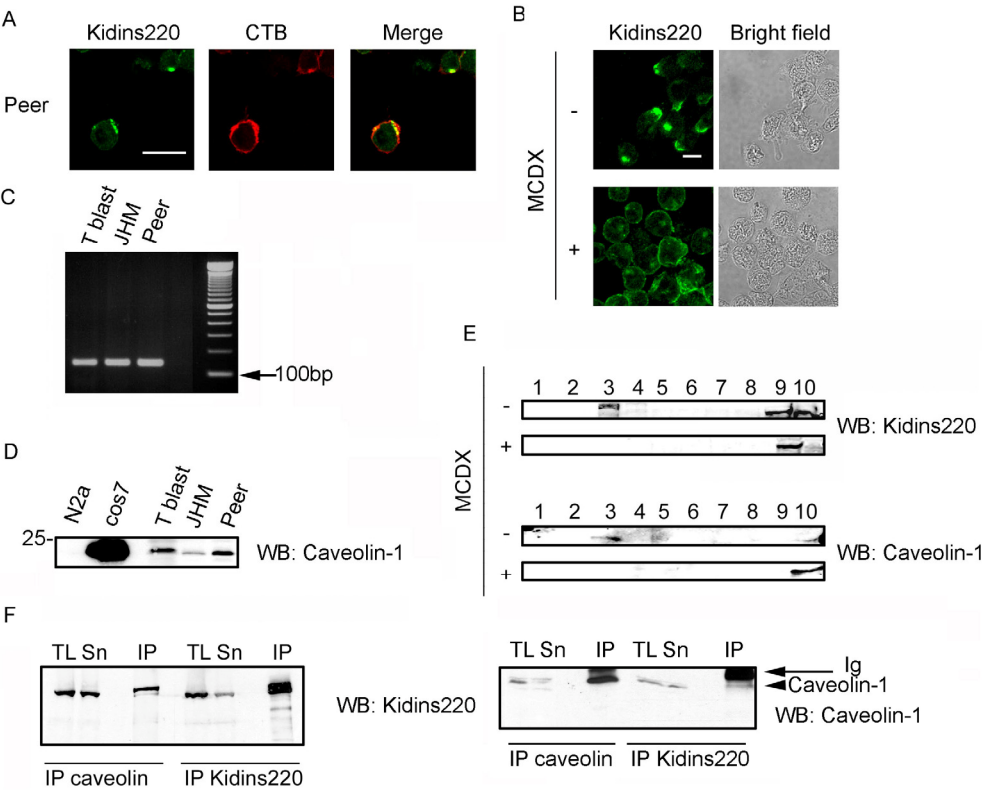


Fig 5.

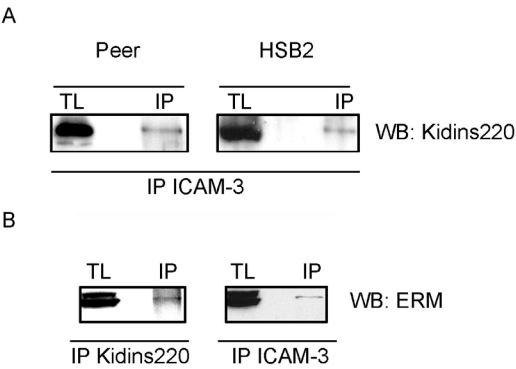
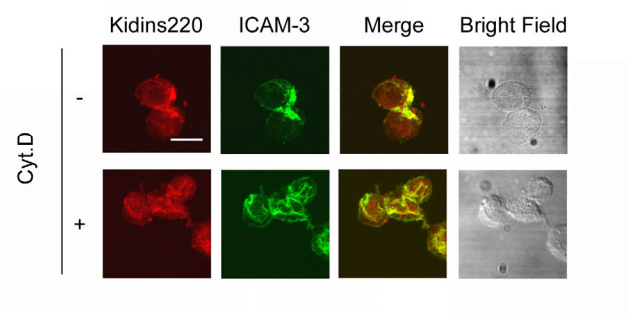


Fig 6.

A



B

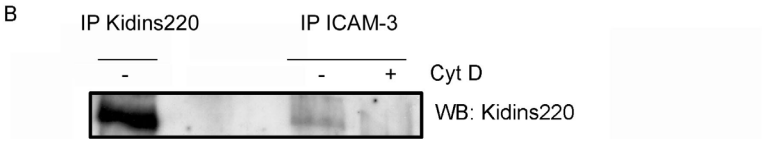


Fig 7.

